

Untersuchungen zum Verständnis von Substrat-Liganden-Affinität mit Hilfe von *Proteinase Engineering*

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I - Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anastasia Tziridis

aus Frankfurt am Main

Vom Institut für Biochemie und Biotechnologie
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
als Dissertation angenommen:

Erstgutachter:

Prof. Dr. M. T. Stubbs

Zweitgutachter:

Prof. Dr. G. Klebe

Drittgutachter:

Prof. Dr. Rick A. Engh

Tag der mündlichen Prüfung:

24.04.2008

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Milton T. Stubbs am Institut für Biotechnologie des Fachbereichs Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Zeit von November 2002 bis Februar 2006 durchgeführt.

Mein herzlicher Dank gilt:

- Prof. Dr. Milton T. Stubbs für die interessante und herausfordernde Aufgabenstellung, für das entgegengebrachte Vertrauen und für die Möglichkeit des durch und durch freien Arbeitens.
- Dr. Daniel Rauh für die gründliche Einarbeitung in das Themengebiet und die stets gute Betreuung während der ersten 18 Monate dieser Arbeit.
- Prof. Dr. Gerhard Klebe für die Möglichkeit der Einarbeitung in das Thema in seinem Arbeitskreis und der Datensammlung am Röntgengenerator.
- Dr. Jörg Stürzebecher (†) und der Firma Curacyte Chemistry, Jena, für die Bereitstellung der Inhibitoren und Testung der Varianten.
- Prof. Dr. Rainer Rudolph und Dr. Hauke Lilie für die freundliche Aufnahme in das Institut, für die Mitbenutzung sämtlicher Geräte und die Anregungen und Diskussionsbereitschaft bei Fragestellungen.
- Dr. Christoph Parthier für die ständige Unterstützung u.a. bei sämtlichen Computerangelegenheiten.
- Dr. Piotr Neumann für die Unterstützung bei vielen kristallographischen Problemstellungen, insbesondere für das Lösen der P1-Struktur.
- Dr. Eva Bosse-Dönecke und Heiko Pultke für die Bereitstellung der getesteten Fusionsproteine.
- Allen Mitarbeitern des Institutes für Biotechnologie, insbesondere bei den „Milties“, für die freundliche Zusammenarbeit und die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre.
- Dr. Angelika Schierhorn für die massenspektroskopische Untersuchungen und Auswertungen.
- Prof. Dr. Norbert Sträter für die Messzeiten am Röntgengenerator in Leipzig.
- Dr. Hans Bartunik und Dr. Gleb Bourenkow der MPI Beamline BW6/DORIS am DESY in Hamburg für ihre Hilfe bei der Datensammlung.
- Dr. Uwe Müller der Protein Structure Factory in Berliner Beamline BL14.1 des BESSY für die Hilfe bei der Datensammlung.
- Pia Rosenberg und Diana Lieber für die tatkräftige Mitarbeit im Labor.
- Ada Linkies und Corinna Daus für das Korrekturlesen.

Zusammenfassung

Durch die wissenschaftlichen Fortschritte in den letzten zwei Jahrzehnten auf den Gebieten der Molekularbiologie, Biochemie und Biotechnologie ist man heute in der Lage, Proteine maßgeschneidert und in großem Maßstab herzustellen. Nur so ist es möglich, ausreichende Mengen z. B. an proteinogenen Medikamenten zur Verfügung stellen zu können. Eine wichtige Gruppe der Proteine stellen Proteinasen dar. Diese sind Enzyme, welche andere Proteine spalten. Sie sind in der Natur weit verbreitet, wo sie unterschiedlichste Funktionen ausüben.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden Varianten der Serinproteinase Trypsin gezielt modifiziert, ihre Struktur röntgenkristallografisch aufgeklärt und ihre Spezifität untersucht, insbesondere die strukturelle Ähnlichkeit untereinander und die Selektivität unterschiedlicher Substrate bzw. Inhibitoren. Als Zielobjekte wurden die miteinander verwandten Serinproteinasen Trypsin, Gerinnungsfaktor Xa und Enterokinase ausgewählt: Trypsin stammt aus der Bauchspeicheldrüse von Säugern vor und ist biotechnologisch relativ leicht herstellbar. Der Gerinnungsfaktor Xa ist ein Schlüsselenzym der Blutgerinnung und daher ein Angriffsort für die Arzneistoffsuche. Enterokinase aus dem Dünndarm von Säugetieren ist eine zur Spaltung von Fusionsproteinen häufig eingesetzte Proteinase.

Ausgangspunkt der Untersuchungen war ein Faktor Xa-Trypsin-Modellsystem, das dazu diente, mit Hilfe von strukturbasiertem Wirkstoffdesign Proteininhibitoren zu entwickeln. Bei diesem Modellsystem wurde durch ortsgerichtete Mutagenese der Substratbindetasche des Trypsins die spezifitätsbestimmenden Merkmale der Substratbindetasche des Gerinnungsfaktors Xa übertragen. Dabei hatte sich eine Flexibilität bei Trypsin im Bereich der Substratbindetasche gezeigt, die sich sowohl auf die Struktur des Enzyms als auch auf die Enzymhemmung bedeutend auswirkte. In der vorliegenden Arbeit wurden in zwei weiteren Ansätzen zusätzliche Mutationen eingeführt, um die aufgetretene Flexibilität zu steuern. In einem dritten Ansatz wurde die Spezifität des Rindertrypsins derart verändert, dass es als Surrogat für Enterokinase zur Spaltung von Fusionsproteinen dienen kann.

Im ersten Ansatz wurde durch Mutation eines Serin-Restes zu Cystein erfolgreich ein molekularer Schalter in die Proteinase eingeführt. Dadurch lies sich bei der aktiven Proteinase die Thiol-Gruppe des neu eingeführten Cysteins *in vitro* kovalent mit der organischen Quecksilberverbindung *p*-Chloromercuribenzoat umsetzen. Durch den sperrigeren Rest der Seitenkette konnte der flexible Bereich der Bindetasche stabilisiert werden, was schließlich in der Kristallstruktur sichtbar wurde.

Der zweite Ansatz verfolgte die Kontrolle der Flexibilität durch sterische Hinderung. In einem Bereich im Inneren der Proteinase, der an die Bindetasche mit der aufgetretenen

Flexibilität angrenzt wurden zusätzlich zu den Mutationen im Faktor Xa-Trypsin-Modellsystem weitere Mutationen hinzugefügt. Der Rest Val 227 wurde durch Ile bzw. Phe ausgetauscht in Kombination mit einer Mutation in Position 217, wodurch vier neue Varianten entstanden. Die Einführung der Reste in Position 227 führte zunächst zu keiner strukturellen Veränderung, sondern vielmehr zu einer Verschlechterung der Hemmkonstanten (K_i -Werte der getesteten Inhibitoren). Zusammen mit der weiteren Mutation des Restes 217, der an den flexiblen Bereich angrenzt, konnte eine Variante erhalten werden, die keine Flexibilität mehr aufweist und sowohl strukturell als auch den enzymkinetischen Daten nach dem Faktor Xa gleichwertig ist.

Für die Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten wurden im Labormaßstab insgesamt fünf neue Varianten hergestellt, kristallisiert und kinetisch mit zwei verschiedenen Substraten und acht verschiedenen, niedermolekularen Inhibitoren charakterisiert. Mit der Methode des molekularen Ersatzes wurden insgesamt 24 Inhibitor-Protein-Kristallstrukturen gelöst. Dabei traten drei neue Kristallformen der Trypsin-Varianten auf.

Eine weitere Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit bestand darin, die Spezifität des Trypsins durch Mutationen in spezifitätsbestimmenden Bereichen derart zu verändern, dass es Eigenschaften der strukturell verwandten Proteinase Enterokinase erhält, einer Proteinase, die häufig für die Trennung von Fusionsproteinen eingesetzt wird. Auf der Basis des rekombinant herstellbaren Rindertrypsins wurde eine neue, enterokinaseähnliche Trypsin-Variante entworfen, die als Ersatz für die Enterokinase dienen sollte. Dieses enterokinaseähnliche Trypsin wurde ähnlich wie die anderen Trypsin-Varianten hergestellt und charakterisiert.

Von Kristallen des enterokinaseähnlichen Trypsins konnte die Struktur gelöst werden. An vier verschiedenen Fusionsproteinen wurde das enterokinaseähnliche Trypsin getestet. Dabei zeigte sich, dass dieses die untersuchten Fusionsproteine sogar schneller spalten kann als die kommerzielle Enterokinase. Außerdem wurde getestet, ob die Nutzung des enterokinaseähnlichen Trypsins im präparativen Maßstab durchführbar ist. Sowohl im Batch-Verfahren als auch nach Kopplung an eine Säule ist das enterokinaseähnliche Trypsin aktiv und lässt sich vom Substrat problemlos abtrennen.

Die in der Arbeit untersuchten Beispiele der veränderten Proteinase Trypsin zeigen, dass sich Spezifitäten von Proteinasen relativ leicht abwandeln lassen, sich aber die resultierenden Proteinmutationen höchst komplex auswirken können. Um das große Spektrum der Auswirkungen bei Proteinmutationen verstehen zu können, ist es dienlich, die sich daraus ergebenden Fragestellungen durch weitere Untersuchungsmethoden zu erörtern und somit die Kenntnisse von Proteinmutationen wertvoll zu ergänzen.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Inhaltsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Proteinasen	9
1.1.1 Eigenschaften von Proteinasen.....	9
1.1.2 Klassifizierung von Proteinasen	9
1.1.2.1 Serinproteinasen	10
1.1.2.2 Cysteinproteinasen	10
1.1.2.3 Asparatproteinasen	10
1.1.2.4 Metalloproteinasen.....	10
1.1.3 Regulation von Proteinasen	11
1.1.4 Spezifität und Selektivität	11
1.1.5 Proteinasen: Nutzung als Werkzeuge in Wissenschaft und Diagnostik	13
1.1.5.1 Fusionsproteine.....	13
1.1.5.2 Trennung von Fusionsproteinen.....	14
1.1.5.3 weitere Einsatzgebiete für Proteinasen	16
1.1.6 Proteinasen: Target für Wirkstoffe.....	16
1.2 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18
1.2.1 Trypsin	18
1.2.2 Blutgerinnung und Gerinnungsfaktor Xa	22
1.2.3 Enterokinase	23
1.2.4 Die Faktor Xa-Bindetasche in Trypsin: ein Modellsystem für Protein-Ligand-Wechselwirkungen	25
1.2.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit	28
1.2.5.1 Einbau eines molekularen Schalters zur Regulation der Proteinflexibilität.....	28
1.2.5.2 Modifizierung des Inneren eines Enzyms zur Steuerung der Proteinflexibilität	29
1.2.5.3 Modifizierung der Enzymspezifität: Design einer Restriktions-Proteinase.....	29
1.2.5.4 Realisierung der Arbeiten.....	30
2 Material und Methoden.....	31
2.1 Geräte und Zubehör.....	31
2.2 Chemikalien, Enzyme, Kits.....	32
2.3 Bakterien, Vektoren, Oligonukleotide	33
2.4 Mikrobiologische Methoden	34

2.4.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	34
2.4.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.4.3	Plasmidpräparation	35
2.4.4	Ortsgerichtete Mutagenese	35
2.4.5	Verdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen	36
2.4.6	Agarose-Gelelektrophorese	36
2.4.7	DNA-Sequenzanalyse.....	36
2.4.8	Flüssigkulturen	37
2.4.9	Plattenkulturen	37
2.4.10	Fermentation von <i>E. coli</i>	38
2.4.11	Zellernte	38
2.4.12	Aufbewahrung von Bakterien	38
2.5	Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden	39
2.5.1	Proteinpräparation.....	39
2.5.2	<i>Inclusion Body</i> -Reinigung	39
2.5.3	Rückfaltung	39
2.5.4	Aktivierung	39
2.5.5	Affinitätschromatografische Reinigung.....	40
2.5.5.1	Reinigung an SBTI-Agarose.....	40
2.5.5.2	Reinigung an Nickel-NTA-Sepharose	40
2.5.6	Bestimmung der Proteinkonzentration	41
2.5.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
2.5.8	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen	42
2.5.9	Bestimmung der Inhibitionskonstanten	42
2.5.10	Bestimmung Kinetischer Parameter.....	43
2.5.11	Massenspektrometrie.....	43
2.5.12	Gefriertrocknung	43
2.6	Röntgenkristallografie - Theorie	44
2.6.1	Kristallisation	44
2.6.2	Kristalle	45
2.6.3	Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen	46
2.6.4	Die Lösung des Phasenproblems	50
2.6.5	Der Molekulare Ersatz.....	51
2.6.6	Von der Dichtekarte zum Modell	52
2.7	Röntgenkristallografie - Praktische Ausführung	52
2.7.1	Kristallisieren.....	52
2.7.2	Datensammlung	54
2.7.3	Datenauswertung und Strukturlösung	55
2.7.4	Modellbau und Verfeinerung	55
2.7.5	Grafische Darstellungen.....	55
3	Ergebnisse und Diskussion: Steuerung der Proteinflexibilität	56
3.1	Expression, Kristallisation und Charakterisierung der Trypsin-Varianten.....	56

3.2	Teil A: Chemische Steuerung der Proteinflexibilität - Einbau eines molekularen Schalters	60
3.3	Teil B: Sterische Hinderung der Proteinflexibilität - Modifizierung des Inneren eines Enzyms.....	64
3.3.1	TripleSer217Ile227-Variante	64
3.3.2	TripleSer217Phe227-Variante.....	69
3.3.3	TripleGlu217Ile227-Variante	71
3.3.4	Triple Glu217Phe227-Variante.....	72
3.3.5	Bildung eines Isoaspartat-Restes bei Aminosäure Asn 115.....	74
3.4	Diskussion der Teile A und B: Hinderung der Proteinflexibilität	75
3.4.1	Posttranslationale Modifikationen.....	80
3.5	Ausblick.....	82
4	Ergebnisse und Diskussion: Modifizierung der Enzymspezifität.....	84
4.1	Design einer Restriktions-Proteinase	84
4.2	Strategie und Design.....	84
4.3	Herstellung und Charakterisierung des enterokinaseähnlichen Trypsins.....	85
4.4	Qualitativer Nachweis der Aktivität des enterokinaseähnlichen Trypsins.....	87
4.4.1	Selbstspaltung.....	87
4.4.2	Substratspaltung	89
4.5	Vorbereitende Versuche für die praktische Anwendung des enterokinaseähnlichen Trypsins.....	94
4.5.1	Spaltung des Fusionsproteins im Batch-Verfahren	94
4.5.2	Immobilisierung des enterokinaseähnlichen Trypsins, Spaltung an gepackter Säule.....	95
4.6	Diskussion: Schlussfolgerungen aus den Versuchen des enterokinaseähnlichen Trypsins.....	96
4.7	Ausblick: Einsatzmöglichkeiten des enterokinaseähnlichen Trypsins	97
Anhang		99
A.1	Verzeichnis der Abkürzungen und englischer Fachbegriffe	99
A.2	Abkürzungen der Aminosäuren.....	101
A.3	IUPAC-Nomenklatur der Inhibitoren.....	102
Literaturverzeichnis		103
Erklärung		112
Lebenslauf		113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Terminologie nach Schechter und Berger	12
Abbildung 2	Primäre Spezifitäten von Proteinasen	13
Abbildung 3	Trypsin, Faktor Xa und Enterokinase	19
Abbildung 4	Aktives Zentrum des Trypsins.....	20
Abbildung 5	Blutgerinnung und Fibrinolyse	23
Abbildung 6	Übersicht über die Trypsin-Varianten	26
Abbildung 7	Konformationen der flexiblen Schleife	27
Abbildung 8	Strategie zur Steuerung der Flexibilität: Mutationen in den Positionen 174 und 227	28
Abbildung 9	Kristallgitter und Einheitszelle	45
Abbildung 10	Amplitude, Phase und Wellenlänge	47
Abbildung 11	Bragg-Ebenen	49
Abbildung 12	<i>p</i> -Chloromercuribenzoat und Quecksilber-II-chlorid.....	54
Abbildung 13	Strukturformeln der Inhibitoren	57
Abbildung 14:	Einbau eines molekularen Schalters	61
Abbildung 15	SSCI-Variante ohne und mit PCMB.....	62
Abbildung 16	Bindungsmodi der Inhibitoren I	68
Abbildung 17	Bindungsmodi der Inhibitoren II.....	70
Abbildung 18	Alternativer Bindungsmodus des Inhibitors (5)	73
Abbildung 19	Grafischer Vergleich der K_i -Werte.....	74
Abbildung 20	D-Isoaspartat 115	75
Abbildung 21	Schema der spontanen Deamidierung, Isomerisierung und Racemisierung von Asparagin- und Aspartat-Resten (nach Watanabe <i>et al.</i> , 1999).....	81
Abbildung 22	Vergleich der ,99er'-Schleife bei Enterokinase und Rindertrypsin.....	84
Abbildung 23	Strategie des Enterokinase-ähnlichen Trypsins.....	85
Abbildung 24	Proteinkristall des enterokinaseähnlichen Trypsins	86
Abbildung 25	,99er'-Schleife und Histidin-Tag des enterokinaseähnlichen Trypsins.....	86
Abbildung 26	Selbstspaltung des enterokinaseähnlichen Trypsins im Vergleich	88
Abbildung 27	Schematische Darstellung der untersuchten Fusionsproteine	90
Abbildung 28	SDS-PAGE von Fusionsprotein A.....	90
Abbildung 29	SDS-PAGE von Fusionsprotein B	91
Abbildung 30	SDS-PAGE von Fusionsprotein C.....	92
Abbildung 31	SDS-PAGE von Fusionsprotein D.....	93
Abbildung 32	eGFP-Spaltung und Abtrennung im Batchverfahren.....	94
Abbildung 33	eGFP-Spaltung an enterokinaseähnlicher Trypsin-Sepharose	96

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Oligonukleotide.....	33
Tabelle 2	Ausbeuten der Trypsin-Varianten.....	56
Tabelle 3	Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme-Statistik: SSCI-Variante	58
Tabelle 4	Verfeinerungsstatistik: SSCI-Variante	58
Tabelle 5	Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme-Statistik: TripleXxx217Xxx227-Varianten	58
Tabelle 6	Verfeinerungsstatistik: TripleXxx217Xxx227-Varianten.....	60
Tabelle 7	K _i -Werte-Vergleich: SSCI-Variante und SSXI-Varianten.....	63
Tabelle 8	Enzymkinetische Parameter I	65
Tabelle 9	Enzymkinetische Parameter II	65
Tabelle 10	Ausbeute des enterokinaseähnlichen Trypsins	86
Tabelle 11	Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme-Statistik: enterokinaseähnliches Trypsin	87
Tabelle 12	Verfeinerungsstatistik: enterokinaseähnliches Trypsin.....	87

1 Einleitung

Proteine sind neben der Erbsubstanz DNA die am häufigsten vorkommenden Biopolymere. Ihr Name leitet sich vom griechischen Wort *πρωτος* ab und bedeutet ‚der Erste‘, ‚der Beste‘. Die Aufgaben, Funktionen und Modifikationen der Proteine sind vielfältig und doch bestehen sie aus einer überschaubaren Zahl von Einzelbausteinen, den Aminosäuren.

Proteine sind für die Industrie von großem Interesse und werden heute für die verschiedensten Zwecke verwendet. Zum einen sind sie Zielorte für Wirkstoffe, zum anderen sind sie selber Agenzien für Anwendungen. Früher wurden sie aus natürlichen Quellen extrahiert und aufwändig gereinigt, wodurch nur relativ geringe Mengen zur Verfügung standen. Die Enzyme Chymotrypsin, Trypsin oder Lysozym gehören zu diesen und sind schon lang bekannte und gut untersuchte Proteinmoleküle. Sie und andere Proteine eignen sich daher als Modellsubstanzen für Experimente für die gezielte Wirkstoffsuche (Stubbs *et al.*, 1995).

Durch die Fortschritte in den letzten zwei Jahrzehnten auf den Gebieten der Molekularbiologie, Biochemie und Biotechnologie ist man heute in der Lage, sämtliche Proteine zielgerichtet und in großem Maßstab herzustellen. Nur so ist es möglich, ausreichende Mengen z. B. an proteinogenen Medikamenten zur Verfügung stellen zu können. Der *tissue type*-Plasminogen-Aktivator (tPA, Melchor *et al.*, 2005), der vom menschlichen Organismus zur Auflösung von Blutgerinnseln ausgeschüttet wird, hat im Gewebe eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten. Durch die Gewinnung des rekombinanten tPA steht für die Therapie von lebensbedrohlichen Gefäßverschlüssen nun ein zuvor nie dagewesenes Medikament zur Verfügung (Juttler *et al.*, 2006; Actilyse®, Dr. Karl Thomae; Rapilyse®, Roche Pharma).

Der Einsatz von semisynthetisch hergestelltem, humanisiertem Insulin hatte vor einigen Jahren die Diabetes mellitus-Therapie revolutioniert. Für die Patienten gab es dadurch ein Insulin, welches dem körpereigenen Insulin gleich und dadurch nebenwirkungsfrei ist. Seit den Achtziger Jahren des letzten Jahrhunderts ist es möglich, das Humaninsulin auf biotechnologischem Wege und somit in hohen Ausbeuten in *Escherichia coli*-Bakterien herzustellen (Schatz *et al.*, 2006). Die Anzahl an Diabetes mellitus-Patienten steigt weltweit von Jahr zu Jahr an, so dass der Bedarf an essentiellm Insulin schon heute nur durch die biotechnologische Herstellung in Hochleistungsbetrieben gedeckt werden kann (Zuendorf *et al.*, 2001).

Auf der Suche nach innovativen Arzneimitteln wurde die Aminosäuresequenz von Humaninsulin dahingehend verändert, dass es im Körper des Patienten im Vergleich zum physiologischen Insulin schneller wirksam (Insulin lispro, Humalog®, Lilly; Rami *et al.*,

1997) oder über einen längeren Zeitraum (Insulin glargin, Lantus®, Sanofi-Aventis; McKeage *et al.*, 2001) verfügbar ist.

Weiterhin wurden Proteinmoleküle gezielt modifiziert, um ihre Eigenschaften dem jeweiligen Bedarf anzupassen. So wurden z.B. Proteinasen, Lipasen und Amylasen synthetisiert und als Waschmittelzusätze verwendet. Diese sind auch noch bei Waschttemperaturen aktiv, die höher sind als bei ihrem natürlichen Temperaturoptimum (Olsen *et al.*, 1998).

Die Antikörper-Technologien sind weiter gereift, so dass die Herstellung monoklonaler Antikörper relativ leicht durchführbar ist. Diese werden als Diagnostika für Standardtechnologien (Immunoassays) oder als Arzneimittel erfolgreich gegen verschiedene Krebsarten (Cetuximab, Erbitux®, Merck Pharma) und Rheuma (Infliximab, Remicade®, Essex Pharma) oder entzündliche oder Autoimmunerkrankungen (Efalizumab, Raptiva®, Serono) eingesetzt (Kim, S. J. *et al.*, 2005).

Weiterentwicklungen beim Proteindesign zielen unter anderem darauf ab, u. a. die positiven Bindeeigenschaften von Proteinspezies zu kombinieren und in neuen Proteinen mit neuartigen Eigenschaften zu vereinen, um sie als Werkzeuge für industrielle und pharmazeutische Zwecke nutzen zu können (Hey *et al.*, 2005).

1.1 Proteinasen

1.1.1 Eigenschaften von Proteinasen

Eine wichtige Gruppe der Proteine stellen Proteinasen dar. Diese sind Enzyme, welche andere Proteine hydrolysieren. Sie sind in der Natur weit verbreitet, wo sie ganz unterschiedliche Funktionen ausüben. Virale Proteinase schneiden die Vorläufermoleküle von Virus-Hüllproteinen. Bakterien produzieren viele verschiedene extrazelluläre Proteinase, um in ihrer nächsten Umgebung fremde Proteine abzubauen. Höhere Organismen nutzen Proteinase für Funktionen wie die Verdauung, die Spaltung von Signalpeptiden innerhalb der Zelle oder für die Regulation von Blutdruck und Blutgerinnung.

Viele Proteinase existieren als Domänen in größeren, multifunktionalen Proteinen, andere sind unabhängige, kleinere Polypeptidketten. *In vivo* ist die Aktivität vieler Proteinase durch endogene Inhibitoren, die die Proteinase komplexieren und dadurch hemmen, kontrolliert.

1.1.2 Klassifizierung von Proteinasen

Obwohl Proteinase in ihrer Funktion gleich sind, sie alle hydrolysieren Peptidbindungen ihrer Substrate, lassen sie sich nach verschiedenen Gesichtspunkten klassifizieren, so z.B. nach Kompartiment (extra-, intrazellulär), nach Angriffsort am Substrat (Endo- und

Exopeptidasen) oder nach ihrem Mechanismus (Serin-, Cystein-, Aspartyl- und Metalloproteinasen) (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, 1992). Die Peptidase-Datenbank MEROPS (Rawlings *et al.*, 2000) klassifiziert Proteinase wiederum nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit.

1.1.2.1 Serinproteinasen

Eine große Gruppe von Proteinase stellen die Serinproteinasen dar. Sie besitzen in ihrem katalytischen Zentrum (*active site*) die Aminosäure Serin. Die Reaktion einer Serinproteinase mit einem Substrat verläuft in zwei Schritten: Im ersten Schritt entsteht im aktiven Zentrum der Proteinase eine Bindung zwischen dem Carbonyl-Kohlenstoffatom des Substrates und dem Hydroxyl-Sauerstoffatom des Serins. Dies ist möglich, weil das Proton des Hydroxyl-Sauerstoffatoms durch eine benachbarte Aminosäure, dem Histidin, stabilisiert ist, welches wiederum durch einen anliegenden Aspartat-Rest stabilisiert ist. Dabei durchläuft das entstandene Acyl-Enzym-Intermediat einen negativ geladenen Übergangszustand, bei dem die Bindungen des Carbonyl-Kohlenstoffatoms tetraedisch koordiniert sind, im Gegensatz zur planaren, trigonalen Geometrie in einer Peptidbindung. Von dem Intermediat diffundiert ein Peptid-Fragment ab, das andere Fragment bildet eine kovalente Acyl-Enzym-Verbindung, die im zweiten Schritt durch ein Wassermolekül hydrolysiert wird. Dadurch wird das zweite Peptid-Fragment mit neuem Carboxy-Terminus frei und die Proteinase besitzt wieder ihr freies Hydroxyl-Sauerstoffatom. Auch im zweiten Schritt entsteht ein tetraedrischer Übergangszustand. Vertreter von Serinproteinasen finden sich z.B. beim Menschen im Hämostasesystem (Gerinnungsfaktor VIIIa, Gerinnungsfaktor Xa, Plasmin) im Verdauungssystem (Trypsin, Elastase, Carboxypeptidase A, Enterokinase) oder im Immunsystem (Trypsin, Granzyme).

1.1.2.2 Cysteinproteinasen

Cysteinproteinasen (z.B. Papain, Cathepsine) funktionieren in gleicher Weise wie Serinproteinasen, mit dem Unterschied, dass als reaktiver Rest die Thiol-Gruppe eines Cysteins mit dem Substrat reagiert. Caspasen sind Cysteinproteinasen und spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose (Johnson, 2000).

1.1.2.3 Aspartatproteinasen

Aspartatproteinasen nennt man auch saure Proteinase, da sie zwei Asparaginsäure-Reste im reaktiven Zentrum besitzen, der die Substrathydrolyse katalysiert. Beispiele hierfür sind die virale Proteinase des HI-Virus-1 (HIV-1) oder das im menschlichen Magen vorkommende Pepsin oder Renin, das bei der Blutdruckregulation eine Rolle spielt.

1.1.2.4 Metalloproteinasen

Zur Gruppe der Metalloproteinasen zählen z.B. gewebeabbauende Kollagenasen, die Exopeptidase Carboxypeptidase A und die extrazellulären Matrixmetalloproteinasen. Im

aktiven Zentrum von Metalloproteinasen fungiert ein zweiwertiges Kation als reaktiver Rest. Dieses ist von den Aminosäureseitenketten der Proteinase koordiniert gebunden, so dass es in der Lage ist, ein Wassermolekül zu aktivieren, welches die Peptid-Bindung angreift und spaltet.

1.1.3 Regulation von Proteinase

Ebenso wichtig wie die Funktion im Organismus ist eine exakte Regulation der Proteinaseaktivität, um eine falsches Freisetzen von Signalmolekülen zu unterbinden.

Die Regulierung der Aktivität von Proteinase kann auf der Ebene der Transkription durch differenzierte Expression und auf der Proteinebene erfolgen. Neben der Kompartimentierung, der Modulation durch Co-Faktoren und der Zymogenaktivierung (Freisetzung aus einer Vorstufe und nach Bedarf) bietet die Interaktion von Proteinase mit Inhibitoren eine ganz wesentliche Kontrollmöglichkeit der proteolytischen Aktivität. Bei den Proteinaseinhibitoren kann man physiologische (endogene) von synthetischen (exogene) Inhibitoren unterscheiden. Die endogenen Inhibitoren höherer Organismen sind, soweit bekannt, ausschließlich Proteine (Bode *et al.*, 1992). Sie hemmen in der Regel nur Vertreter innerhalb einer Proteinaseklasse (Laskowski *et al.*, 1980). Die so genannten *Serpine*, wie z.B. Antithrombin und Alpha-1-Antitrypsin, sind wichtige Hemmstoffe der Serinproteinase Thrombin bzw. Trypsin.

Neben den direkt wirkenden Proteinaseinhibitoren kann man auch indirekt wirkende bzw. allosterische Inhibitoren unterscheiden, die durch Bindung an eine Region entfernt von der *active site* wirken. Diese Bindung verhindert dann weitere Reaktionen der Proteinase, z. B. ihre Dimerisierung (Shiozaki *et al.*, 2003). Eine detaillierte und übersichtliche Darstellung der verschiedenen Arten der Proteinase-Proteininhibitor-Interaktionen ist von Krowarsch *et al.*, 2003, beschrieben worden.

1.1.4 Spezifität und Selektivität

Alle Proteinase haben dasselbe Substrat, nämlich Polypeptidketten von Proteinen. Jedoch spalten innerhalb einer Familie verschiedene Proteinase die Polypeptidketten der Substrate bei Aminosäuren mit bestimmten Eigenschaften. Die strukturelle Basis für diese Präferenz bzw. Spezifität der Proteinase liegt in den Seitenketten, die an die Substratbindetasche der Proteinase angrenzen.

Die Spezifität ist eine Eigenschaft eines Enzyms. Sie beschreibt, wie streng das Enzym bei der Wahl seines Substrates ist. Wenige Enzyme besitzen eine absolute Spezifität, die bewirkt, dass sie nur eine ganz bestimmte Reaktion katalysieren. Andere Enzyme sind spezifisch für eine bestimmte Art von chemischer Bindung oder funktioneller Gruppe. Wie das Substrat in das aktive Zentrum eines Enzyms passt, ist von essentieller Bedeutung für das Resultat der Enzym-Substrat-Reaktion. Die zu spaltende Bindung muss eine spezielle Orientierung zu den Aminosäureseitenketten der aktiven Reste einnehmen. Der wichtigste

Aspekt für die strukturelle Eignung eines Substrates für ein Enzym ist die Aminosäuresequenz um die zu spaltende Bindung herum.

Die Selektivität dagegen ist die Eigenschaft eines Substrates und gibt an, in welchem Maß ein Substrat von verschiedenen Enzymen gebunden und gespalten wird. Eine gute Aussage über die Selektivität wird durch das Verhältnis der enzymkinetischen Parameter von k_{cat}/K_m wiedergegeben. Ein synthetisches Substrat wird in der Regel von mehreren Enzymen gespalten, d.h. es ist nicht völlig selektiv. Ein natürliches Substrat wird hingegen nur von wenigen Enzymen gespalten. Dieser Unterschied erklärt sich dadurch, dass natürliche Substrate in der Regel erheblich größer sind als synthetische und in den meisten Fällen eine bestimmte dreidimensionale Struktur annehmen, die sowohl mit dem aktiven Zentrum als auch auf andere Oberflächenstrukturen des Enzyms wirkt.

Die Terminologie, die verwendet wird, um die Spezifität von Proteinasen zu beschreiben, leitet sich von einem Modell nach Schechter und Berger ab (Schechter *et al.*, 1967), wonach der Rest des Substrats N-terminal der zu spaltenden Peptidbindung ($\vdash$, **Abbildung 1**) als P1, der vorhergehende als P2 usw. bezeichnet wird. Analog hierzu werden die Reste C-terminal der zu spaltenden Peptidbindung mit P1', P2', P3' usw. bezeichnet. In gleicher Weise werden die Bindetaschen der Proteinase, die die Seitenketten des Substrats aufnehmen, mit S1, S2, S3 ... bzw. S1', S2', S3'... bezeichnet.

Substrat: N-...- P4 - P3 - P2 – P1 $\vdash$ P1' - P2' - P3' - P4'-...-C
 Enzym: ...- S4 - S3 - S2 - S1 - S1' - S2' - S3' – S4'-...

Abbildung 1 Terminologie nach Schechter und Berger

Die zu spaltende Bindung wird mit $\vdash$ dargestellt. P1 ist der Rest des Substrats, der N-terminal der zu spaltenden Peptidbindung, P2 der vorhergehende usw. P1', P2' usw. sind die nachfolgenden. Analog dazu werden die Bindetaschen des Enzyms S1, S1, ... bzw. S1', S2'... benannt.

Wie gut das Substrat zum aktiven Zentrum eines Enzyms passt, ist von essentieller Bedeutung für das Ergebnis der Enzym-Substrat-Reaktion. Der wichtigste Faktor bezüglich der strukturellen Eignung als Substrat ist die Aminosäuresequenz in der Umgebung der zu spaltenden Bindung. Die zu spaltende Bindung muss eine spezifische Orientierung zu den Aminosäureseitenketten des aktiven Zentrums (bei Serinproteinasen: zur katalytischen Triade, s.u.) besitzen. Die unterschiedlichen Spezifitäten innerhalb einer Enzymfamilie lassen sich anhand der Chymotrypsin-Familie veranschaulichen. Die Enzyme Chymotrypsin, Trypsin und Elastase besitzen eine sehr ähnliche dreidimensionale Struktur, jedoch unterschiedliche Spezifitäten: Chymotrypsin spaltet bevorzugt Substrate mit großen, aromatischen Seitenketten in Position P1, Trypsin zeigt Präferenz für Substrate mit basischen Seitenketten und Elastase für kleine, ungeladene Seitenketten. Drei Aminosäurereste in den Positionen 189, 216 und 226 sind verantwortlich für diese

Spezifitäten. Diese Aminosäurereste begrenzen die Seiten der so genannten S1-Bindetasche. Bei Chymotrypsin und Trypsin sind diese Reste Glycine. Sie erlauben es der Seitenkette des Substrates in das Innere der Bindetasche einzudringen. Bei der Elastase sind es Val und Thr in den Positionen 216 und 226, die die Bindetasche mit ihren hydrophoben Seitenketten ausfüllen, und die Affinität zu Substraten mit kleinen, ungeladenen Seitenketten begründen. Der Aminosäurerest in Position 189 befindet sich jeweils am Boden der S1-Bindetasche der Enzyme. Bei Trypsin befindet sich in Position 189 ein Asp, welches mit den positiv geladenen Seitenketten von Lys oder Arg eines Substrates interagiert. Bei Chymotrypsin ist es ein Ser, welches nicht mit dem Substrat in Wechselwirkung tritt. Sperrige, aromatische Reste werden daher bevorzugt und können die hydrophobe Bindetasche ausfüllen.

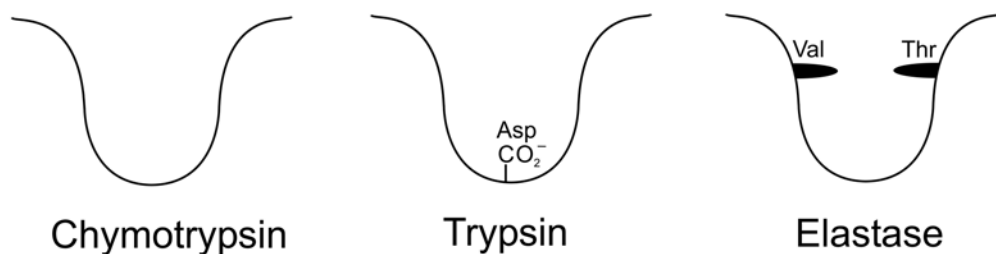


Abbildung 2 Primäre Spezifitäten von Proteinasen

Stark vereinfachte Darstellung eines Ausschnitts aus dem Substratbindungszentrum der Serinproteinasen Chymotrypsin, Trypsin und Elastase (nach Stryer, 1991). Die primären Spezifitäten der Proteinasen werden durch die Aminosäureseitenketten in der S1-Bindetasche beeinflusst: Bei Trypsin interagiert ein Asp am Boden der S1-Bindetasche mit dem Substrat, bei Elastase ist die Wechselwirkung durch die hydrophoben Seitenketten von Val und Thr bestimmt. Dagegen können bei Chymotrypsin große, aromatische Reste des Substrates die Bindetasche ausfüllen.

1.1.5 Proteinase: Nutzung als Werkzeuge in Wissenschaft und Diagnostik

Die Eigenschaft, die Enzyme zu einem besonders wichtigen Werkzeug in Wissenschaft und Diagnostik macht, ist ihre bereits dargestellte Spezifität für eine Reaktion. So werden Proteinase sehr häufig bei biotechnologischen Herstellprozessen zur Spaltung von Fusionsproteinen eingesetzt, um bestimmte Sequenzen abzuspalten.

1.1.5.1 Fusionsproteine

In den meisten Strategien mit Fusionsproteinkonstrukten wird das Protein von Interesse an das C-terminale Ende des Fusionspartners gesetzt, wodurch eine Initiierung der Translation an einer bekannten Stelle und eine möglichst hohe Ausbeute ermöglicht werden sollen. Es gibt eine Reihe von verschiedenen Fusionsmöglichkeiten, die Vorteile für die Expression in Bezug auf Ausbeute oder Löslichkeit der Proteine bieten. Durch die entsprechende Wahl des Fusionspartners erhält das Konstrukt verschiedene, vorteilhafte Eigenschaften, wie z.B. eine spezifische Bindung an Liganden für Aufreinigungsprozesse, die Möglichkeit zur Detektion, die proteolytische und strukturelle Stabilisierung des Proteins oder eine spezifische zelluläre Lokalisation (Arnau *et al.*, 2005). Beispiele für

Fusionspartner von Proteinen, die dem Konstrukt eine spezifische Affinität verleihen sind Peptidsequenzen mit mehreren aufeinander folgenden Histidinen, ein sog. *His-Tag*. Mit diesem ist die Reinigung des Proteins sowohl unter nativen als auch unter denaturierenden Bedingungen möglich (Porath, 1992). Weitere Beispiele für Fusionspartner sind die Glutathion-S-Transferase (GST, Smith *et al.*, 1988) oder das *maltose binding protein* (MBP, Fox *et al.*, 2003). Durch eine Kopplung an das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP, Chalfie *et al.*, 1994) lassen sich Fusionsproteine einfach durch die UV-Absorption detektieren. Um unlösliche Peptide oder Proteine als lösliche Proteine zu exprimieren, eignet sich SUMO (*small ubiquitin-related modifier*) als Fusionspartner (Butt *et al.*, 2005; Malakov *et al.*, 2004).

In den letzten Jahren wurden sogenannte *tandem affinity purification*-Systeme entwickelt, bei denen das Protein von Interesse von zwei *Tags*, d.h. sowohl N- als auch C-terminal, flankiert ist (Waugh, 2005). Dadurch kann man bei der Isolierung und Reinigung eines Proteins verschiedene, spezifische Affinitätsmechanismen ausnutzen.

1.1.5.2 Trennung von Fusionsproteinen

Diese nützliche, physikalische Assoziation der Protein-Domänen bei Fusionsproteinen kann jedoch problematisch sein, wenn die kovalenten Verbindungen zur Isolierung der Domänen gelöst werden müssen. Die Methode der Proteintrennung muss sowohl spezifisch als auch effizient sein und sollte keine unerwünschten Nebenprodukte erzeugen. Eine brauchbare Methode ermöglicht die Spaltung an einer spezifischen Sequenz, ohne die interne Proteinsequenz und/oder die des Fusionspartners zu beeinträchtigen. Außerdem sollte sie Spaltprodukte mit intakten N- und C-Termini ohne Modifikationen erzeugen und unter verschiedenen Bedingungen anwendbar sein, so dass ein Protein ‚nach Maß‘ hergestellt werden kann.

In wenigen spezifischen Fällen ist es möglich, den Affinitäts-*Tag* unter relativ drastischen chemischen Bedingungen abzuspalten, z. B. mit Zyanbromid oder Hydroxylamin. Dazu bedarf es eines einzigen Methionin-Restes, der an der Verbindungsstelle zwischen den Fusionspartnern platziert ist (Rais-Beghdadi *et al.*, 1998). Chemische Methoden sind eher unspezifisch und können zu unerwünschter Proteindenaturierung und Seitenkettenmodifizierungen führen (Nilsson *et al.*, 1997). Enzymatische Methoden sind dagegen spezifischer, und die Spaltung findet unter milden Reaktionsbedingungen statt.

Um eine gezielte Trennung des Fusionsproteins zu erreichen, muss es an der gewünschten Position eine Spaltstelle enthalten, die durch eine Proteinase spezifisch erkannt und gespalten wird. Verschiedene Endoproteinasen werden für die *Tag*-Abspaltung eingesetzt und wurden diesbezüglich weiterentwickelt. Enterokinase, der physiologische und sehr spezifische Aktivator des Trypsinogens, und die Blutgerinnungsfaktoren Thrombin und Faktor Xa sind die für diesen Zweck am häufigsten verwendeten Enzyme (Jenny *et al.*, 2003; Liew *et al.*, 2005).

Die Enterokinase und Faktor Xa sind Beispiele für Proteinasen, die die Proteinsequenz des Substrates unabhängig von ihrer Aminosäuresequenz an der C-terminalen Seite der Spaltstelle (P1'-Position) trennen. Lediglich die P-Position müssen eine spezifische Sequenz besitzen. Dies ermöglicht die komplette Abspaltung des *Tags* und die Gewinnung des nativen Proteins. Die Herstellung eines *Tag*-freien Proteins ist verpflichtend für die Herstellung von Proteinen für den therapeutischen Einsatz. Bei der Spaltung mit Endoproteinasen wie z. B. Thrombin, *virus-derived* TEV Proteinase (*tobacco etch virus*) oder 3C-Proteinase bleiben nach der Substratspaltung ein oder zwei Aminosäurereste an der Spaltstelle an der N-terminalen Seite des Proteins übrig (Hefti *et al.*, 2001; Kim, A. R. *et al.*, 2005; Leong, 1999). In diesen Fällen müsste zunächst untersucht werden, welchen Effekt die zusätzliche Aminosäure auf das Protein oder seine Wirkung ausübt.

Andere Klassen von Endoproteinasen wurden ebenso für die *Tag*-Abspaltung entwickelt. Granzym B ist eine lysosomale Serinproteinase, die physiologisch an vielen Aktivierungsprozessen in höheren Eukaryonten beteiligt ist. Eine Neuentwicklung ist ein sich selbstaktivierendes Granzym B für *Tag*-Abspaltungen, welches über eine große Substratspezifität verfügt (Loretsen *et al.*, 2005). Caspase-6, eine Proteinase, die bei der Proteinprozessierung während der Apoptose eine Rolle spielt, wird auch genutzt um z. B. GST-Fusionsproteine zu spalten (Purbey *et al.*, 2005).

Bei Fusionsproteinkonstrukten mit dem SUMO-System werden die Fusionspartner durch Zugabe der SUMO-Proteinase-1 gelöst. Die SUMO-Proteinase-1 erkennt insbesondere die Konformation des *Tags* und weniger die spezifische Sequenz (Butt *et al.*, 2005). Die Expression mit dem SUMO-System gelingt nur in *E. coli*-Kulturen, da in eukaryontischen Zellen mehrere SUMO-Proteinasen vorhanden sind und das Fusionsprotein schon während der Fermentation spalten.

Generelle Nachteile der Endoproteinase-vermittelten Fusionsproteinspaltung sind die ungünstigen Verhältnisse von Endoproteinase zu Protein und die langen Inkubationszeiten, um eine vollständige Proteinabspaltung zu erreichen, da das Fusionsprotein in der Regel nicht das natürliche Substrat der Endoproteinase ist.

Eine weitere Komplikation ist die Tatsache, dass es unter den gegebenen Bedingungen zu unspezifischen Spaltungen des Proteins kommt (weitere Gly-Arg-Sequenzen im Fusionsprotein für Faktor Xa oder basische Aminosäuren für Enterokinase), welche zu unerwünschtem Proteinabbau und somit zu geringeren Ausbeuten führen.

Ein genereller Trend für die industrielle Proteinproduktion ist die Entwicklung von *on column*-Affinitätsreinigungs- und *on column-Tag*-Abspaltungssystemen. Die Mehrfachverwendung von Affinitätssäulen und Prozessenzymen stellt einen großen Vorteil für die Herstellung großer Proteinmengen dar, weil dies materialsparend ist und schnellere Prozesse mit höheren Ausbeuten ermöglicht. Es wurden bereits derartige Systeme mit

gängigen und effizienten Affinitäts-*Tags* und Endoproteinasen entwickelt (Nilsson *et al.*, 1997; Einhauer *et al.*, 2001; Mao, 2004; Kim, A. R. *et al.*, 2005).

1.1.5.3 weitere Einsatzgebiete für Proteinasen

Ein weiterer Einsatz für Proteinasen ist das Gebiet der Proteomics. Dort werden sie bei der massenspektroskopischen Analyse für die Probenvorbereitung von Proteinen verwendet. Hierbei wird häufig Trypsin eingesetzt, wodurch Peptidfragmente entstehen, die im Massenspektrum den für jedes Protein spezifischen *fingerprint* liefern (Kellner *et al.*, 1999).

Aufgrund ihrer differenzierten Expression werden Proteinasen als sogenannte Biomarker für die frühe Diagnostik von Krankheiten eingesetzt und können in bestimmten Fällen sogar als prognostische Marker dienen. Hieraus lässt sich die geeignete Therapie herausfiltern, unabhängig von der Proteinase als *target*. Diese Strategie wird bei der Krebsdiagnostik angewendet. Die Serinproteinase Plasminogenaktivator ist ein relevanter Marker für die Diagnose und Prognose bei Brust- und anderen Krebsarten (Look *et al.*, 1999). Ein weiterer Tumormarker ist die Serinproteinase Kallikrein 3, besser bekannt als PSA (*prostate-specific-antigen*), die bei Prostatakrebs detektiert wird. Neuerdings kennt man auch Cysteinproteinasen als Biomarker bei rheumatischen Erkrankungen (Cathepsin B, Lai *et al.*, 2004) und parasitären Infektionen (Cazzulo *et al.*, 2004).

Durch biotechnologische Methoden lässt sich sogar die Funktion von Proteinasen umkehren. Der gezielte Umbau der Serinproteinase Subtilisin führt zu Enzymen mit veränderter Spezifität. So führt der Austausch des katalytischen Ser 221 gegen Cystein zu einer Ligase, d.h. zu einem Enzym das Peptide verknüpft (Abrahamsen *et al.*, 1991, Chang *et al.*, 1994). Diese neuen Enzyme können bei Peptid-Synthesen zum Einsatz kommen, die mit herkömmlichen Peptid-Synthesemethoden nicht durchführbar sind.

Je nach durchzuführender Synthese kann man sich gezielter Enzyme und gewünschter Produktbausteine bedienen (Bordusa, 2002). Trypsin kann in einem geeigneten Medium, z.B. in ionischen Flüssigkeiten, und durch zusätzliche, ortsgerichtete Mutationen für die Ligation von Peptiden und Peptidomimetika eingesetzt werden (Grünberg *et al.*, 2000; Bordusa *et al.*, 2005).

1.1.6 Proteinasen: Target für Wirkstoffe

Proteolytische Enzyme spielen eine wichtige Rolle in zahlreichen intra- und extrazellulären Stoffwechselprozessen im gesunden wie im kranken Organismus, z.B. bei der Homöostase des Blutes (Davie *et al.*, 1991), bei der Immunantwort, bei der Verdauung, bei der Apoptose (Neurath, 1984) oder bei der Tumorzellmetastasierung (Reunig *et al.*, 1998). Fehl- und Überfunktion der Proteinasen äußern sich daher in vielen verschiedenen Krankheitssymptomen. Folglich sind sie ein wichtiger Angriffspunkt für die Erkennung, Behandlung oder Linderung von Krankheiten.

Die Darstellung einer erfolgreichen Weiterentwicklung von Proteinaseinhibitoren sind die Hemmstoffe für das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE, Peptidyl-dipeptidase A). Die Inhibitoren des ACE werden zur Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen (Bluthochdruck, koronare Herzkrankheit, etc.) eingesetzt. Das ACE ist eine Zinkmetalloproteinase und eines der zentralen Enzyme im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System, welches bei der Blutdruckregulation eine wichtige Rolle spielt (Zaman *et al.*, 2002). Zunächst noch zufällig von Inhibitoren für eine andere Proteinase abgeleitet, wurden niedermolekulare Inhibitoren nach den herkömmlichen Methoden für ACE entwickelt. Nachdem die Kristallstruktur des ACE verfügbar war, konnten anhand der neu gewonnenen Erkenntnisse spezifischere Inhibitoren mit geringeren Nebenwirkungen entwickelt werden (Lisinopril, Coric®, Bristol-Myers Squibb; Acharya *et al.*, 2003). Die Proteinase zeigte sich als Heterodimer, bei dem die beiden Proteindomänen unterschiedliche Funktionen und Spezifitäten besitzen (Natesh, *et al.*, 2003).

Noch nicht auf dem Arzneimittelmarkt, aber bereits in der späten Entwicklung befinden sich Proteinaseinhibitoren zur Behandlung von Diabetes Typ II. Schon in den späten 1980er Jahren wurden die so genannten Inkretine (z.B. *Glucagon-like peptide 1* (GLP 1) und *glucose-dependent insulintropic peptide* (GIP)) als blutzuckersenkende Hormone identifiziert, wodurch sie sowohl direkt als auch indirekt als *target* für die Diabetestherapie genutzt werden können. GLP 1 und die verwandten Peptide werden in vivo schnell durch die Serinproteinase Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV) abgebaut (Mentlein *et al.*, 1993; Kieffer *et al.*, 1995). DPP IV ist eine membranassoziierte Proteinase und spaltet Dipeptide bevorzugt nach Prolinresten ab. Derzeit sind mehrere Inhibitoren der DPP IV in der klinischen Erprobung (Demuth *et al.*, 2005, Kim, D. *et al.*, 2005, Augeri *et al.*, 2005).

Um selektive und hochaffine, potentielle Arzneistoffe zu entwerfen, ist es von großem Vorteil, die strukturellen Beschaffenheiten von Protein-Komplexen zu verstehen. Die Röntgenkristallografie, eine Methode, welche für die strukturbasierte Wirkstoffsuche und für die schnelle und effiziente Entwicklung von innovativen Arzneistoffen essentiell ist (Blundell *et al.*, 2004), gibt uns bis hin zur atomaren Ebene Einblick in die Funktion von Stoffwechselprozessen (Fuhrmann *et al.*, 2004). Somit erlaubt sie uns eine genaue Analyse der strukturellen Elemente von Proteinen. Anhand der gewonnenen Erkenntnisse können bereits am Computer potentielle Wirkstoffe entworfen und ihre Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Ein bemerkenswertes Beispiel hierbei ist die Entwicklung des Wirkstoffs (Ritonavir, Norvir®, Abbott) Die strukturbasierte Wirkstoffsuche ermöglichte seine Entwicklung innerhalb weniger Jahre (Klebe, 2001).

Allerdings sind computergenerierte Moleküle in Abwesenheit experimenteller Daten nur eingeschränkt charakterisierbar. Eine elementare, aber noch wenig berücksichtigte Problemstellung ist die Flexibilität von Molekülen. Es konnte gezeigt werden, dass sogar die Bioverfügbarkeit wirkstoffähnlicher Moleküle durch ihre Flexibilität beeinflusst wird (Veber *et al.*, 2002) Dagegen ist noch wenig über die funktionelle Flexibilität von Proteinen

und ihre Bedeutung bekannt. Sie kann eine wesentliche Rolle bei biochemischen Prozessen spielen (Gerstein *et al.*, 2004; Klinge, 2001).

Moderne Computerprogramme sind derzeit nicht in der Lage, die Flexibilität von Proteinmolekülen hinreichend in Berechnungen miteinzubeziehen. Modellsysteme, wie das in der vorliegenden Arbeit untersuchte (Rauh *et al.*, 2002; Rauh *et al.*, 2004) oder das der Proteinkinase A (Breitenlechner *et al.*, 2004), zeigen, dass die Bindungseigenschaften von potentiellen Arzneistoffen nicht befriedigend vorausgesagt werden können.

1.2 Zielsetzung dieser Arbeit

Obwohl es schon viele technische, diagnostische und therapeutische Anwendungen von Proteinen bzw. Enzymen gibt, sind diese häufig durch ihre natürliche Spezifität limitiert.

Um die Eigenschaften von Proteinasen zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit insbesondere die strukturelle Ähnlichkeit und die Selektivität unterschiedlicher Substrate bzw. Inhibitoren anhand von drei gebräuchlichen Proteinasen und ihrer modifizierten Varianten untersucht.

Als Zielobjekte wurden die miteinander verwandten Serinproteinasen Trypsin, Faktor Xa und Enterokinase ausgewählt: Trypsin kommt in der Bauchspeicheldrüse von Säugern vor und ist biotechnologisch relativ leicht herstellbar. Faktor Xa ist ein Schlüsselenzym der Blutgerinnungskaskade und daher ein *target* für die Arzneistoffsuche. Enterokinase aus dem Dünndarm von Säugetieren ist eine zur Spaltung von Fusionsproteinen häufig eingesetzte Proteinase.

In den folgenden drei Kapiteln werden die Eigenschaften dieser drei betrachteten Serinproteinasen erläutert. In einem weiteren Abschnitt wird das Faktor Xa-Trypsin-Modellsystem vorgestellt, auf dem die Untersuchungen der Kapitels 3 basieren.

1.2.1 Trypsin

Trypsin wurde erstmals 1876 von Kühne beschrieben und benannt als ‚die proteolytische Aktivität der Pankreassäfte‘ (Kühne, 1876). Das Grundwissen für viele Serin-Endopeptidasen wurde aus Studien mit Trypsin abgeleitet (Perona *et al.*, 1995); somit kann man es als Prototyp für diese Enzym-Familie ansehen. Trypsin (EC 3.4.21.4) hydrolysiert in Substraten bevorzugt Amidbindungen nach den Aminosäuren Arginin oder Lysin. Sein pH-Optimum liegt bei ungefähr 8, wobei dies zwischen verschiedenen Isoenzymen und verschiedenen Spezies leicht variieren kann. Der Zusatz geringer Mengen Kalziumionen (10-20 mM) ist für die maximale Aktivität und die Stabilität der Proteinase erforderlich (Corey *et al.*, 1992). Sowohl als lyophilisiertes Pulver als auch in salzsaurer Lösung bei pH 2-3 ist Trypsin über mehrere Wochen haltbar (Barrett *et al.*, 1989). In neutraler Lösung tritt jedoch sofort Autolyse und somit die Inaktivierung ein. Trypsin kann aus dem Pankreas gewonnen oder in reinerer Form rekombinant hergestellt

werden. Viele gängige Inhibitoren wie z.B. PMSF, DFP und Benzamidin hemmen Trypsin kovalent bzw. nichtkovalent. Sojabohnentrypsininhibitor (SBTI) oder der aus der Rinderlunge gewonnenen Plasmin-Inhibitor Aprotinin sind Beispiele für peptidische Proteininhibitoren.

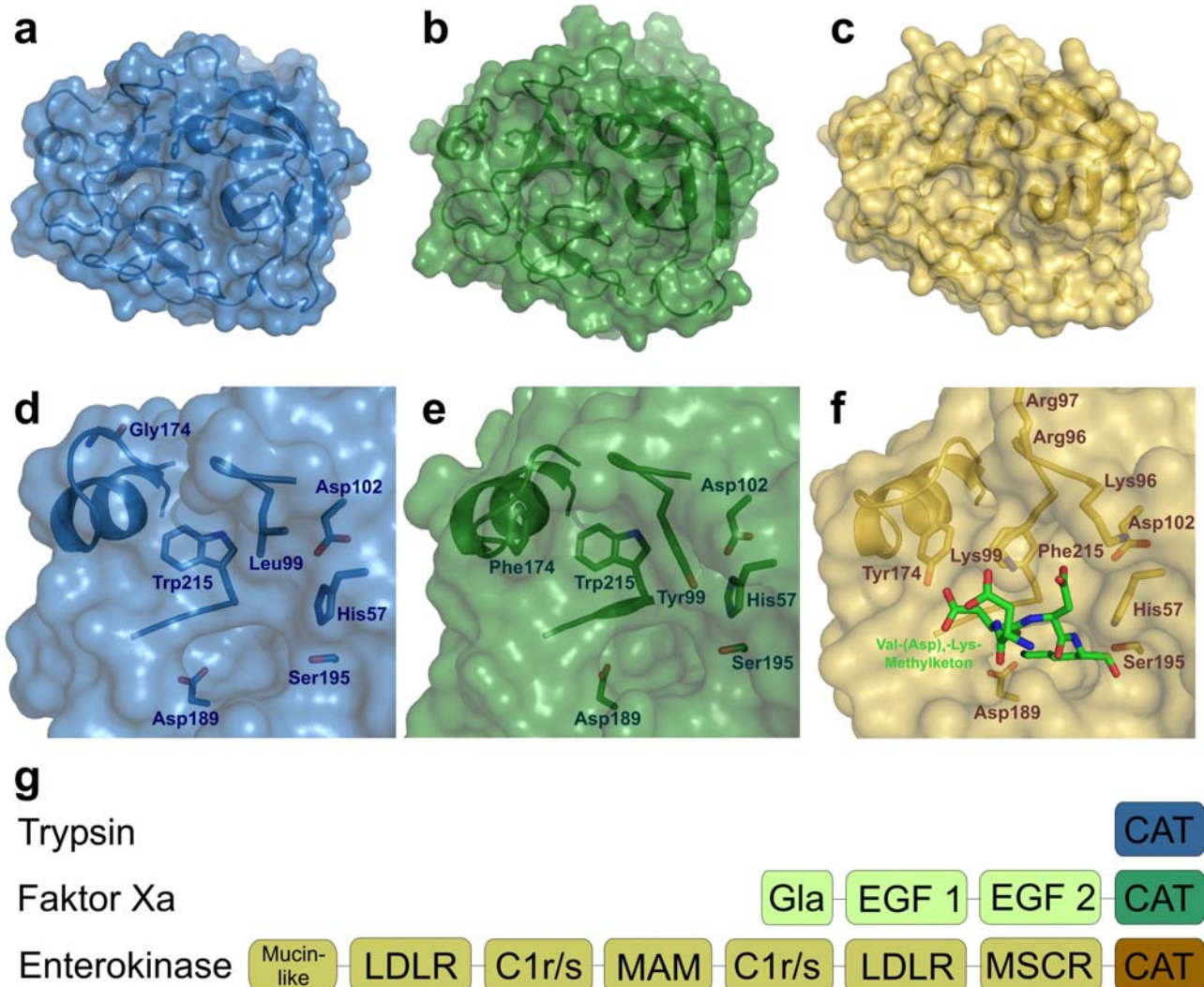


Abbildung 3 Trypsin, Faktor Xa und Enterokinase
Oberfläche und Sekundärstruktur der katalytischen Einheiten von **a** Trypsin, **b** Faktor Xa und **c** Enterokinase [pdb-Code: 1MTS, 1FAX, 1EKB]. In den Bildern **d**, **e** und **f** sind jeweils die *active sites* der drei Proteinasen dargestellt, mit jeweils His57, Asp102 und Ser195 der katalytischen Triade, Asp189 am Boden der S1-Bindetasche, und den Resten 99, 174 und 215, die die Seiten der S3/S4-Bindetasche darstellen. **f**: In der *active site* der Enterokinase sind die Reste (Asp)₄-Lys des Inhibitors Val-(Asp)₄-Lys-Chlormethylketon gezeigt, die u. a. mit dem Rest Lys99 wechselwirken. Bild **g** zeigt schematisch die verschiedenen Domänen, aus denen jeweils die gesamte funktionale Einheit der Proteinasen im physiologischen Zustand bestehen: Trypsin besteht nur aus der katalytischen Einheit. Faktor Xa enthält zusätzlich zwei EGF-ähnliche Domänen und eine γ-Carboxyglutaminsäure-haltige Gla-Domäne, die Kalziumionen binden kann und somit die Wechselwirkung mit Membranstrukturen ermöglicht. Bei der Enterokinase ist die leichte Kette die katalytische Untereinheit, während die schwere Kette spezifitätsbestimmende und membranassoziiierende (*Mucin-like*) Eigenschaften vermittelt.

Die dreidimensionale Struktur des Rindertrypsins (**Abbildung 3a**) wurde im Jahr 1974 von zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander bestimmt (Huber *et al.*, 1974; Stroud *et al.*, 1974) und gilt seitdem als Prototyp für die S1-Klasse von Serinproteinasen (Barrett *et al.*, 1989). Die Tertiärstruktur aller Enzyme der S1-Klasse ist hoch konserviert (Shotton *et al.*,

1970). Obwohl die Primärstrukturen der verschiedenen Trypsine wesentlich variieren können, ist ihre Faltung sehr ähnlich. Zum Beispiel haben die Tertiärstrukturen des kationischen Rindertrypsins und des anionischen Rattentrypsins eine mittlere quadratische Abweichung (*rms deviation*) von nur 0.29 Å zueinander (Sprang *et al.*, 1987), und nur um 1 Å weicht strukturell der hydrophobe Kern des prokaryotischen Trypsins von *Streptomyces griseus* von dem des anionischen Rattentrypsins ab (Read *et al.*, 1988).

Die ungewöhnliche Nummerierung ist historisch bedingt und leitet sich vom Strukturvergleich zwischen Elastase und dem ebenfalls verwandten Chymotrypsin ab (Shotton *et al.*, 1970). So beginnt die Sequenz des Trypsins mit Ile 16 und endet mit Asn 245. Die dreidimensionale Anordnung der wichtigsten Reste, wie die katalytische Triade Asp102/His57/Ser195 (**Abbildung 3d**), sind in den beiden Proteinasen identisch.

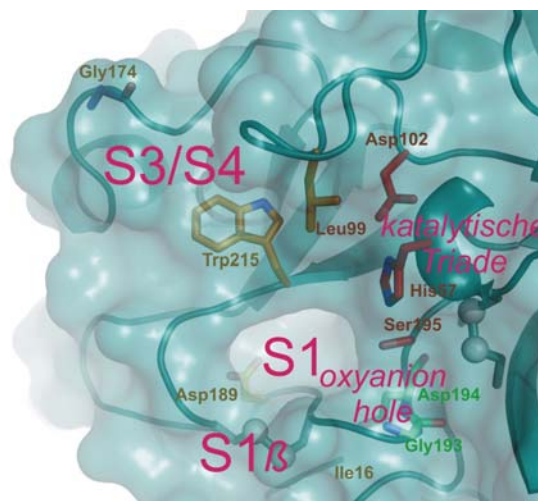


Abbildung 4 Aktives Zentrum des Trypsins

Die Aminosäureseitenketten Ser 195, His 57 und Asp 102 stellen die katalytische Triade in der *active site* dar. Die Reste des Gly 193 und Asp 194 bilden das so genannte *oxyanion hole*. Am Boden der S1-Bindetasche ist Asp 189 lokalisiert, welches über ionische Wechselwirkungen mit dem P1-Rest des Substrates interagiert. Dazu benachbart ist die S1_β-Bindetasche. Die Reste Leu 99, Gly 174 und Trp 215 kleiden die S3/S4-Bindetasche aus und verleihen ihr einen hydrophoben Charakter.

Aktives Trypsin ist ein globuläres Enzym mit einer molaren Masse von ungefähr 24 kDa. Es besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die die katalytische Einheit darstellt (**Abbildung 3g**) und in der die Reste der katalytischen Triade zwischen zwei β -Barrel-Domänen liegen. Sechs konservierte Disulfidbrücken an den Positionen 22-157, 42-58, 128-232, 136-201, 168-182 und 191-220 verleihen dem *backbone* (Hauptkette des Proteins) Stabilität. Andere Formen des Trypsins, in dem die Polypeptidkette geschnitten ist, besitzen noch unterschiedliche Restaktivitäten (Higaki *et al.*, 1985). Die katalytische Triade ist Teil eines ausgedehnten Wasserstoffbrückennetzwerkes. Wasserstoffbrücken bestehen zwischen N δ 1-H des His 57 und O δ 1 des Asp 102 sowie zwischen der Hydroxyl-Gruppe des Ser 195 und N ϵ 2 des His 57. Letztere Wasserstoffbrücke geht während der enzymatischen Katalyse verloren, wenn His 57 protoniert ist und Ser 195 den intermediären, tetraedrischen Acyl-Enzym-Komplex mit dem Substrat ausgebildet hat. Untersuchungen an verschiedenen Trypsinmutanten haben ergeben, dass trotz des

Austausches verschiedener Reste in so genannten Schlüssel-Funktionen (Asp102Asn, His57Ala, Ser195Ala) dennoch eine Restaktivität erhalten bleibt (Craik *et al.*, 1987; Corey *et al.*, 1992), vermutlich durch andere strukturelle Charakteristika des Enzyms, die den tetraedrischen Komplex stabilisieren.

Alle natürlich vorkommenden Trypsine werden als Präproenzyme von den Acinuszellen des Pankreas synthetisiert und als Trypsinogen in sekretorischen Granula gespeichert. Nach der Ausschüttung des Pankreassaftes in den Dünndarm wird die Vorstufe Trypsinogen entweder durch die dort befindliche Enterokinase (s.u.), die mit der Dünndarmmembran assoziiert ist, oder durch bereits im Dünndarm befindliches, aktives Trypsin ein 20 Aminosäuren langes Propeptid abgespalten und somit aktiviert. Einmal aktiviert ist die Proteinase für den Abbau der durch die Nahrung zugeführten Proteine sowie für die weitere Aktivierung der Vorstufen sämtlicher Verdauungsenzyme wie Chymotrypsinogen, Prolipase, Procarboxypeptidase und Proelastase zuständig.

Das Propeptid des Trypsins aller Säugetiere besteht in der Regel mindestens aus einem Hexapeptid und enthält eine konservierte Sequenz für die Abspaltung durch Enterokinase, -(Asp)₄-Lys gefolgt von der reifen N-terminalen Sequenz, z.B. Ile 16-Val 17-Gly 18-Gly 19 beim Rindertrypsin. Durch die Abspaltung des Propeptids dreht sich der Rest Asp 194 und interagiert mit dem neuen N-Terminus Ile 16 und die Wasserstoffbrücken-Bindung zwischen His 40 und Asp 194 ist unterbrochen. Diese konformelle Änderung bewirkt zum einen die Ausbildung des *oxyanion hole* (**Abbildung 4**), welches von den Amidfunktionen von Gly 193 und Ser 195 umgeben ist, und zum anderen die Formation der Bindetaschen (Feldhammer *et al.*, 1977; Bode *et al.*, 1978).

Bei der Substratspaltung bildet das gebundene Peptid ein antiparalleles β -Faltblatt zur Bindetasche. Die Substratspezifität wird in erster Linie durch Asp 189, welches am Boden der primären Substratbindetasche S1 liegt, bestimmt (**Abbildung 4**). Dieses Asp 189 geht elektrostatische Wechselwirkungen mit den für P1 bevorzugten Resten der Seitenketten von Arg oder Lys des Substrats ein. Sekundäre Bindetaschen (S2 und S3/4) auf beiden Seiten der zu hydrolysierenden Amidbindung spielen bei Trypsin für die Bestimmung der Substratspezifität von Inhibitoren nur eine sehr geringe Rolle, obwohl die Besetzung dieser Taschen zur katalytischen Effizienz beiträgt (Corey *et al.*, 1992; Schellenberger *et al.*, 1994). Eine weitere Bindetasche spielt bei der Inhibitorenbindung eine Rolle: Sie ist von der Disulfidbrücke zwischen Cys 191 und Cys 220 und der Schleife aus den Resten 214 bis 220 umgeben und wird als S1 β -Bindetasche (**Abbildung 4**) bezeichnet (Nienhaber *et al.*, 2000).

Ein weiteres Merkmal des Trypsins ist eine hochaffine Kalzium-Bindestelle. Gebundenes Kalzium trägt maßgeblich zur Stabilität des Enzyms bei. Fehlt dieses Ion, tritt schnell der Selbstverdau ein. Diese Bindestelle wird durch die Reste Glu 70 bis Glu 80 gebildet (Bode *et al.*, 1975), in dem das Kalziumion von sechs Bindungspartnern koordiniert wird: die

beiden O ϵ 1-Atome des Glu 70 und Glu 80, die Carbonyl-Sauerstoffatome der Reste Ile 72 und Val 75 und zwei Wassermoleküle (nicht gezeigt).

1.2.2 Blutgerinnung und Gerinnungsfaktor Xa

Das Blutgerinnungssystem, das in vergleichbarer Form allen Wirbeltieren gemein ist, umfasst eine Vielzahl homologer Serinproteinasen (EC 3.4.21), die in einer Kaskade proteolytischer Spaltungen aus inaktiven Vorstufen (Zymogenen) in die aktiven Enzyme umgewandelt werden. Diese inaktiven Proteinvorstufen sind relativ groß; ihre Bildungsorte und die Komplexität ihrer Synthese sind von besonderem Interesse (Schenone *et al.*, 2004). Für die Mehrzahl der Aktivierungen der Proteinvorstufen sind die Anwesenheit von Kalziumionen und die Assoziation zu einer Phospholipidmembran essentiell. Durch Letztere wird die Blutgerinnung auf bestimmte Stellen im Gefäßsystem begrenzt und somit kontrolliert (Thews *et al.*, 1999). Die Blutgerinnungskaskade beim Menschen umfasst zwei sich gegenseitig verstärkende Kaskaden proteolytischer Reaktionen (intrinsisches und extrinsisches System), die zur Bildung eines fibrinhaltigen Blutgerinnsels führen (Davie *et al.*, 1991). Der Gerinnungsfaktor Xa steht an der Schnittstelle dieser beiden Reaktionswege und nimmt somit eine Schlüsselposition ein (**Abbildung 5**). Die Aktivierung des Proenzym Faktor X zu Faktor Xa kann über den extrinsischen Weg durch die Aktivierung durch Faktor VIIa im Komplex mit *tissue factor* (TF), einem integralen Membranprotein, erfolgen. Alternativ dazu kann die Einleitung der Gerinnungskaskade auf intrinsischem Weg geschehen, indem Faktor IXa zusammen mit seinem Kofaktor, Faktor VIIIa, das Zymogen Faktor X zu Faktor Xa umwandelt.

Der Gerinnungsfaktor Xa (EC 3.4.21.6) gehört derselben Enzymfamilie wie Trypsin und Enterokinase an. Faktor X ist das Proenzym des Faktor Xa und wird in der Leber als einkettiges Protein mit einem Signalpeptid gefolgt von einem Propeptid synthetisiert (Furie & Furie, 1988). Das Propeptid dient der Erkennung für die Vitamin K-abhängige Carboxylase, die die N-terminalen Glutamat-Reste des Faktor Xa in γ -Carboxyglutaminsäure (Gla) überführt. Dadurch kann die so genannte N-terminale Gla-Domäne 8-10 Kalziumionen binden, die für die Wechselwirkung mit Phosphatidylserin enthaltenden Strukturen in Membranen erforderlich sind. Die molare Masse des humanen Faktor Xa beträgt 59 kDa. Er besteht aus einer 139 Aminosäuren langen leichten und einer 254 Aminosäuren langen schweren Kette, welche die katalytische Untereinheit bildet (**Abbildung 3b**). Die dreidimensionale Struktur des humanen Faktor Xa ohne N-terminale Gla-Domäne (Reste 1-45) wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt (Padmanabhan *et al.*, 1993; Brandstetter, *et al.*, 1996). So ist die Faltung der katalytischen Untereinheit dem Chymotrypsin und Thrombin sehr ähnlich. His 57, Asp 102 und Ser 195 der aktiven, schweren Kette stellen die katalytische Triade dar (**Abbildung 3e**). Die leichte Kette besteht aus der bereits erwähnten Gla-Domäne, an die sich zwei EGF-ähnliche (*epidermal growth factor*) Domänen anschließen (**Abbildung 3g**). Die C-terminale EGF-ähnliche Domäne steht in Kontakt mit der katalytischen Domäne.

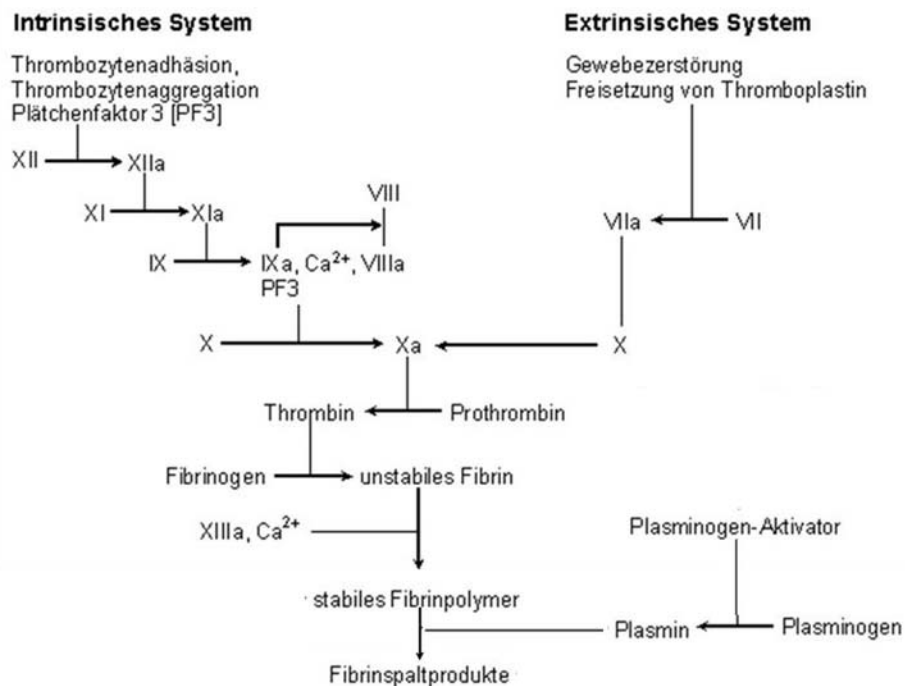


Abbildung 5 Blutgerinnung und Fibrinolyse

Der Blutgerinnungsprozess (nach Thews *et al.*, 1999) wird durch Gefäß- oder Gewebeerzörung ausgelöst und kaskadenartig auf zwei verschiedenen Wegen aktiviert: auf dem extrinsischen Weg erfolgt die proteolytische Aktivierung innerhalb von Sekunden (Faktor VIIa), während der Aktivierungsprozess auf dem intravaskulären Weg über eine größere Zahl von Faktoren (Faktoren XIIa, XIa, IXa, XIIIa) abläuft. Beide Systeme greifen beim normalen Gerinnungsablauf ineinander und bilden Thrombin, welches Fibrinogen in stabiles Fibrin für den Gefäßverschluss umwandelt. An der Schnittstelle beider Gerinnungssysteme steht der Gerinnungsfaktor Xa und stellt somit eine Schlüsselfunktion dar. Unter Fibrinolyse versteht man den proteolytischen Abbau der Fibrinpolymere durch die Proteinase Plasmin, welche aus der inaktiven Vorstufe Plasminogen und unter Einwirkung von Plasminogenaktivator entsteht.

Wie bereits erwähnt, stellt Faktor Xa ein Schlüsselenzym der Gerinnungskaskade und somit ein interessantes *target* für die Behandlung von thromboembolischen Gefäßverschlüssen wie z. B. Herzinfarkt, Schlaganfall oder Venenthrombosen dar (Schenone *et al.*, 2004). Problematisch bei den derzeit verfügbaren Arzneimitteln sind entweder die zu geringe Effizienz (Thrombozytenaggregationshemmer), ihre ungünstige Handhabung (subkutane Applikation der Heparine) oder die zu geringe therapeutische Breite und das damit verbundene, aufwändige *monitoring* (Cumarinderivate). Daher besteht ein großes Interesse an der Entwicklung neuer und vor allem oral verfügbarer Inhibitoren für das Zielprotein Faktor Xa.

1.2.3 Enterokinase

Der gleichen Familie wie Trypsin gehört das Enzym Enterokinase (EC 3.4.21.9) an. Es wurde im Labor von Pavlov (Pavlov, 1902) Anfang des letzten Jahrhunderts entdeckt und von ihm mit Enterokinase benannt, wobei seit 1970 die korrekte Bezeichnung gemäß der *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) Enteropeptidase lautet. Der alte Name Enterokinase ist dennoch weiterhin gebräuchlich und wird hier im Folgenden beibehalten. Die physiologische Rolle der Enterokinase ist die spezifische

Spaltung des Trypsinogens zum aktiven Trypsin. Sie ist mit der Zellmembran des Epithels der Dünndarmschleimhaut assoziiert und dadurch in ihrem Wirkungsbereich begrenzt.

Enterokinase spaltet interne Peptidbindungen an Stellen, die der natürlichen Spaltstelle des Rindertrypsinogens in P1 bis P5, Asp-Asp-Asp-Asp-Lys + Ile, analog sind. Dagegen zeigt Enterokinase eine nur gering ausgeprägte Abhängigkeit von der Struktur der C-terminal gelegenen Reste der Substratspaltstelle (Maroux *et al.*, 1971). Diese bemerkenswerte Spezifität hat Enterokinase zu einem nützlichen Reagenz für die Trennung rekombinanter Fusionsproteine (s.o.), die Enterokinasespaltstellen enthalten, gemacht (Hopp *et al.*, 1989). Viele Jahre sind seit der ersten Isolierung der Schweine-, Rinder- oder humanen Enterokinase (Maroux *et al.*, 1971; Anderson *et al.*, 1977; Grant *et al.*, 1976) vergangen und es besteht weiterhin ein großer Bedarf daran.

Das Enzym ist zwischen pH 6 und 9 mit einem deutlichen Optimum bei pH 8 und bei einer Kalziumionenkonzentration von 4-10mM aktiv. Die Rinderenterokinase ist ein 150 kDa-Enzym mit hohem Kohlenhydratgehalt (30-40%), das aus einer schweren (115 kDa) und einer leichten (35 kDa) Kette besteht, die durch eine oder mehrere Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Liepnieks *et al.*, 1979). Die leichte Kette der Enterokinase ist die katalytische Untereinheit und eine typische trypsinähnliche Serinproteinase (**Abbildung 3c**). Eine Röntgenkristallstruktur der Rinderenterokinase wurde von Lu *et al.*, 1999, gelöst (1EKB). Sie zeigt die katalytische Untereinheit (leichte Kette), die mit einem Rest aus sieben Aminosäuren der schweren Kette über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft ist, im Komplex mit dem Inhibitor Val-(Asp)₄-Lys-Chlormethylketon in der Substratbindetasche (nicht gezeigt). In dieser Struktur ist erkennbar, dass der katalytische Mechanismus und der Kontakt des Lysins an der Substratposition P1 im Vergleich zu anderen trypsinähnlichen Proteinase konserviert sind. Die positiv geladene Seitenkette des Lysins ist in der S1-Bindetasche gegenüber dem Asp 189 positioniert. Die drei aufeinander folgenden Aspartyl-Reste in den Positionen P2 bis P4 des Inhibitors interagieren durch elektrostatische Wechselwirkungen mit der Enzymoberfläche im Bereich der '99er'-Schleife (vier basische Aminosäuren: Lys 96-Arg 97-Arg 98-Lys 99), vorwiegend durch eine Salzbrücke zum Nζ-Atom des Lys 99, wodurch der Inhibitor optimal in die Bindetasche passt (**Abbildung 3f**).

Unter Enterokinasen verschiedener Spezies sind diese vier basischen Reste konserviert und nicht bei anderen Proteinase innerhalb der S1-Familie gefunden worden (LaVallie *et al.*, 1994, Matsushima *et al.*, 1994). Die schwere Kette der Kälberenterokinase vermittelt die Verbindung der katalytischen Untereinheit mit der Bürstensaummembran des Dünndarms, vermutlich durch Wechselwirkung der hydrophoben Domäne nahe dem N-Terminus. Die schwere Kette enthält neben der hydrophoben Domäne weitere strukturelle Motive: eine mucinähnliche Domäne, die hoch glykosyliert ist, zwei Cystein-reiche *low-density lipoprotein*-Rezeptor-Wiederholungen (LDLR), zwei Abschnitte, die in den

Komplementserinproteinasen C1r und C1s (C1r/s) vorkommen, ein MAM-Motiv (MAM) und ein cysteinreiches *macrophage scavenger* Rezeptor-Motiv (MSCR) (**Abbildung 3g**).

1.2.4 Die Faktor Xa-Bindetasche in Trypsin: ein Modellsystem für Protein-Ligand-Wechselwirkungen

Aufgrund unzureichender Kristallisationseigenschaften entzog sich Faktor Xa über viele Jahre hinweg den Methoden eines rationalen Ansatzes für das strukturbasierte Wirkstoffdesign, da hierzu die genaue Kenntnis der Struktur der Proteinase erforderlich ist (Adler *et al.*, 2000; Brandstetter *et al.*, 1996; Kamata *et al.*, 1998; Maignan *et al.*, 2000; Nar *et al.*, 2001). Mit der von Padmanabhan *et al.*, 1993 veröffentlichten Röntgenstruktur von Faktor Xa wurde die erste Modellstruktur verfügbar, an dem sowohl Untersuchungen zur Bindung der bekannten Inhibitoren als auch *molecular modelling* möglich waren. Jedoch war die Kristallisationsbereitschaft des Faktor Xa nicht zufriedenstellend. Im Gegensatz dazu stand die verwandte Serinproteinase Trypsin, dessen leichte Handhabung und schnelle Kristallisation, die relativ einfach durchführbar ist. Daher wurde Trypsin erfolgreich zur strukturellen Analyse der Bindungsmodi von Faktor Xa- Inhibitoren verwendet. (Renatus *et al.* 1998; Stubbs *et al.*, 1995; Whitlow *et al.*, 1999; Pinto *et al.*, 2001; Stubbs *et al.*, 2002;). Zahlreiche Komplexstrukturen lieferten wichtige Hinweise über mögliche Bindungsmodi und affinitätsbestimmende Pharmakophore.

Drei aufeinander folgende Abschnitte, die ,99er'-, die ,175er'- und die ,190er'-Schleife (**Abbildung 3d** und **Abbildung 3e**) repräsentieren die strukturellen Hauptunterschiede der Ligandenbindetasche zwischen Faktor Xa und Trypsin. Die genannten Schleifen sind charakteristisch für die Wechselwirkung von niedermolekularen Inhibitoren mit Faktor Xa und flankieren jeweils die S1-, die S2- und die S3/S4-Bindetasche des Enzyms. Die primäre Spezifitätsbindetasche mit einem Asp 189 für die Wechselwirkung eines P1-Arg-Rests des Substrats besitzt in Position 190 ein Ala. Die S2-Bindetasche ist durch die sperrige Seitenkette des Tyr 99 praktisch verschlossen und lässt nur Gly-Reste für P2 bei Substraten zu. Die S3/S4-Bindetasche, die durch die Seitenketten von Tyr 99, Trp 215 und Phe 174 gebildet wird, hat einen hydrophoben Charakter. Eine weitere, distal gelegene Bindetasche mit elektrophilen Eigenschaften wird durch die Carbonyl-Gruppen der Reste Glu 97, Thr 98 und Ile 176 begrenzt (Stubbs *et al.*, 1995; Brandstetter *et al.*, 1996).

Von diesen Funktionen der Bindetasche des Faktor Xa abgeleitet wurden bereits zahlreiche niedermolekulare Inhibitoren mit hochaffinen und selektiven Eigenschaften beschrieben (Renatus *et al.*, 1998; Shaw *et al.*, 1998, Phillips *et al.*, 1998; Faull *et al.*, 1998, Schweinitz *et al.*, 2006; Arnaiz *et al.*, 1997; Hirayama *et al.*, 2002; Pruitt *et al.*, 2000). Die Struktur eines potenten Faktor Xa-Inhibitors ist im Allgemeinen durch eine basische Gruppe (typischerweise eine Amidgruppe) charakterisiert, die die primäre Spezifitätsbindetasche besetzt und darin sowohl ionische als auch hydrophile Wechselwirkungen mit Asp 189 ausübt. Große, hydrophobe Reste eines Inhibitors

besetzen die S3/S4-Bindetasche. Basische Seitenketten können die elektrophile Bindetasche mit den Carbonyl-Funktionen der Hauptkette der Aminosäuren Thr 98 und Ile 176 und der Seitenkette von Glu 97 nutzen (Renatus *et al.*, 1998).

Generation	1.			2.	3.
Aminosäuren	97 - 99	172-173-174-175	190	217	227
Bov.Trypsin	N - L	Y - P - G - Q	S	S	V
Triple Ser Val	E - Y	S - S - F - I	A	S	V
Triple Glu Val	E - Y	S - S - F - I	A	E	V
Triple Ser Ile	E - Y	S - S - F - I	A	S	I
Triple Ser Phe	E - Y	S - S - F - I	A	S	F
Triple Glu Ile	E - Y	S - S - F - I	A	E	I
Triple Glu Phe	E - Y	S - S - F - I	A	E	F
Faktor Xa	E - Y	S - S - F - I	A	E	I

Abbildung 6 Übersicht über die Trypsin-Varianten

Die Abbildung zeigt einen schematischen Überblick über die Varianten bisheriger Arbeiten und über die Varianten, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden. Dargestellt sind die Positionen der Aminosäuren, die im Rindertrypsin (dunkelblau) schrittweise verändert wurden, um die Bindetasche des Gerinnungsfaktors Xa (dunkelgrün) einzuführen. In der ersten Generation wurden drei Schleifen, Positionen 97 und 99, 172 bis 175 und 190 mutiert, die zur *TripleSer217Val227*-Variante führten. Die Einführung eines Glu in Position 217 (zweite Generation) erzeugte die *TripleGlu217Val227*-Variante. Die Varianten der ersten und zweiten Generation wurden in den Arbeiten von Rauh *et al.*, 2003 & 2004, hergestellt und charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Varianten der dritten Generation (violett unterlegt) hergestellt und untersucht, die zusätzlich an Position 227 weitere Mutationen (Ile bzw. Phe) enthalten.

Um die Selektivität und Spezifität von Protein-Ligand-Wechselwirkungen besser untersuchen zu können, wurde die Bindetasche des humanen Faktor Xa durch ortsgerichtete Mutagenese in das strukturell verwandte Rattentrypsin eingeführt (Reyda *et al.*, 2003). Hierfür wurden die Bindetaschen S1 bis S4 für Mutationen ausgewählt: Ser 190 (,190er'-Schleife) des Trypsins wurde durch Ala ersetzt, um eine hydrophobere S1-Bindetasche zu erhalten. Die Sequenz Ser 172-Ser 173-Phe 174-Ile 175 des Faktor Xa wurde in die so genannte ,175er'-Schleife des Rattentrypsins (Tyr 172-Pro 173-Gly 174-Lys 175) eingeführt, die Reste Glu 97 und Tyr 99 in die ,99er'-Schleife' (Lys 97 und Leu 99 in Rattentrypsin) eingeführt, wodurch die so genannte *Triple*-Variante entstand, die alle drei Schleifen des Faktor Xa enthält. Die Kristallstruktur dieser Variante im Komplex mit dem Inhibitor Benzamidin (**1**) (**Abbildung 13**) zeigte in der ,175er'-Schleife eine signifikant andere Orientierung. Der Hauptunterschied zur Bindetasche des Faktors Xa waren die alternativen Konformationen der Schleife zwischen den Resten Cys 168 bis Cys 182. Die Seitenkette von Phe 174 war dabei im Inneren des Enzyms verborgen, wodurch eine Seite der S3/S4-Bindetasche ganz fehlte. Die α -Helix zwischen den Resten Asp 165 und Ala 170 war dadurch breiter im Durchmesser und zugleich verkürzt. Diese Konformation

der ,175er'-Schleife wurde daher als ,down'-Konformation benannt. Interessante Ergebnisse lieferten *soaking*-Versuche der mit Inhibitor **(1)** kristallisierten *Triple*-Variante mit einem hochaffinen, Faktor Xa-spezifischen Inhibitors (Zeneca-Inhibitor **(6)** **Abbildung 13**). In der Kristallstruktur des Rattentrypsins war zu sehen, dass der gebundene Inhibitor **(1)** durch Inhibitor **(6)** aus der Bindetasche verdrängt worden war und nun in der Bindetasche der Proteinase zu erkennen war. Dazu erschien die ,175er'-Schleife in der Faktor Xa-ähnlichen Konformation. Die Bindung des Inhibitors **(6)** hatte die Reorganisation der flexiblen Schleife von der ,down'- in die ,up'-Konformation bewirkt. Der Inhibitor **(6)** zeigte zudem weitere Besonderheiten, dahingehend, dass er eine pH-Abhängigkeit seines Bindungsmodus zeigt. In Experimenten von Stubbs *et al.*, 2002, mit Rindertrypsin zeigte dieser Inhibitor bei einem pH-Wert von 7 eine völlig andere Orientierungen in der Bindetasche der Proteinase als bei pH 8.

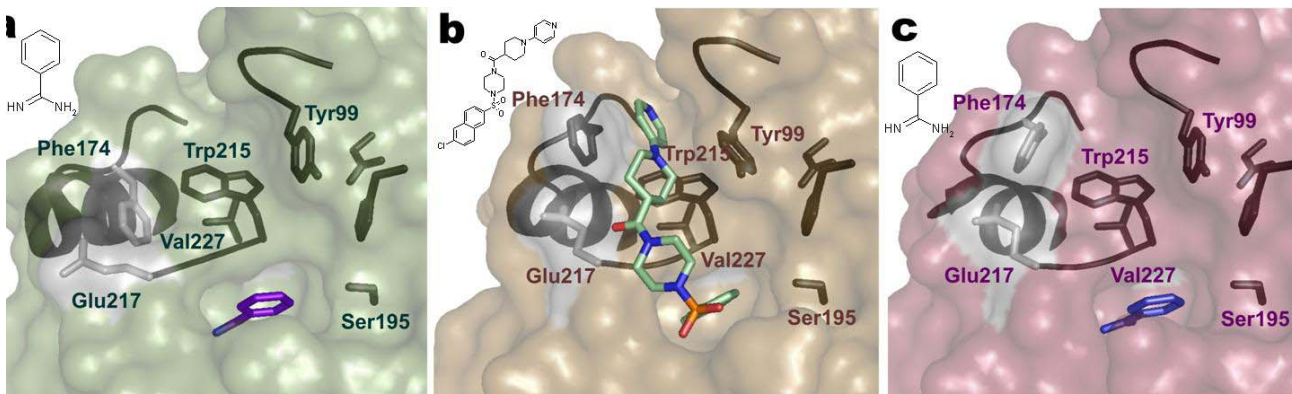


Abbildung 7 Konformationen der flexiblen Schleife

Dargestellt ist die *TripleGlu217Val227*-Variante, die in verschiedenen Kristallformen und Konformationen vorkommt: in **a** ist die ,down'-Konformation dargestellt. Hier ist die Helix aufgeweitet und Phe 174 im Inneren des Proteins vergraben, wodurch es zum Fehlen einer Seite der S3/S4-Bindetasche kommt. In der so genannten ,up'-Konformation (**b**) besitzt die S3/S4-Bindetasche die gleiche Konformation, wie sie im Faktor Xa beobachtet wird. Die Seitenkette des Phe 174 zeigt nach oben und zusammen mit den Resten des Trp 215 und Tyr 99 bildet es eine Bindetasche mit hydrophobem Charakter. In einer dritten Konformation (**c**) zeigt der Rest Phe 174 und die ,175er'-Schleife noch weiter nach oben als in (**b**), wodurch diese als ,super up'-Konformation bezeichnet wird.

Die beim Rattentrypsin eingeführten Mutationen wurden entsprechend auch beim Rindertrypsin durchgeführt (Rauh *et al.*, 2002, Rauh *et al.*, 2003). Die Mutationen in den drei Schleifen des Rindertrypsins erzeugten eine Variante (damals SSFI-Variante genannt, im Rahmen dieser Arbeit als *TripleSer217Val227*-Variante bezeichnet), die jedoch nur die ,down'-Konformation der flexiblen Schleife zeigte und die signifikante Auswirkungen auf die Affinität von Liganden hatte. Weitere Variationen des Phe 174 in der *TripleSer217Val227*-Variante (SSWI-, SSAI- und SSRI-Variante) resultierten in einer ausgeprägten Flexibilität der ,175er'-Schleife und ließen darauf schließen, dass die konformelle Plastizität des Enzyms die Ligandenaffinität in hohem Maße beeinträchtigt (Rauh *et al.*, 2004). Weiterhin zeigte sich, dass der Rest 217, der am Rande der S3/S4-Bindetasche gelegen ist, einen bedeutenden Einfluss auf diese Region ausübt. Der Austausch von Ser 217 im Rindertrypsin mit Glu entsprechend der Struktur des Faktor Xa erzeugte die *TripleGlu217Val227*-Variante, die in einer Vielzahl von Kristallformen auftrat und sowohl die ,down'-, die ,up'- als auch eine neue, so genannte 'super up'-Konformation

(**Abbildung 7a, b, c**) zeigte, jeweils abhängig vom Inhibitor und/oder der Kristallform. Beim Faktor Xa übt die Carboxyl-Gruppe der Seitenkette des Glu 217 Wasserstoffbrücken zum Sauerstoffatom des Ser 172 aus, die vermutlich die ‚175er‘-Schleife stabilisieren und die ‚up‘-Konformation begünstigen (Rauh *et al.*, 2004). Diese Wasserstoffbrücke konnte bei der *TripleGlu217Val227*-Variante in der ‚up‘-Konformation beobachtet werden.

Das vorliegende Modellsystem ist daher gut geeignet, durch gezielte Mutationen den Einfluss der Proteinflexibilität auf die Ligandenbindung zu untersuchen.

1.2.5 Fragestellung der vorliegenden Arbeit

1.2.5.1 Einbau eines molekularen Schalters zur Regulation der Proteinflexibilität

Auf Basis des in Kapitel 1.2.4 vorgestellten Faktor Xa-Trypsin-Modellsystems ist die zentrale Fragestellung in den Kapiteln 3.2 und 3.3 der vorliegenden Arbeit, wie die aufgetretene Flexibilität der ‚175er‘-Schleife in der Faktor Xa-Rindertrypsin-Chimäre kontrolliert und angewendet werden kann.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde folgende Vorgehensweise geplant: Basierend auf der SSFI-Variante der ersten Generation der Varianten aus den Arbeiten von Rauh *et al.*, 2004, sollte eine Variante erzeugt werden, die *in vitro* einer chemischen Modifizierung unterzogen werden kann (**Abbildung 8**). In der so genannten ‚175er‘-Schleife sollte das Phe 174 gegen Cys ausgetauscht werden. Die Thiol-Gruppe des Cys ist in der Lage, mit Schwermetallverbindungen kovalente Bindungen einzugehen. Diese irreversible Reaktion des Cys der neuen SSCI-Variante sollte eine sperrige Seitenkette schaffen, die durch sterische Hinderung die ‚down‘-Konformation nicht zulässt, um so die Faktor Xa-ähnliche ‚up‘-Konformation der flexiblen Schleife zu erhalten.

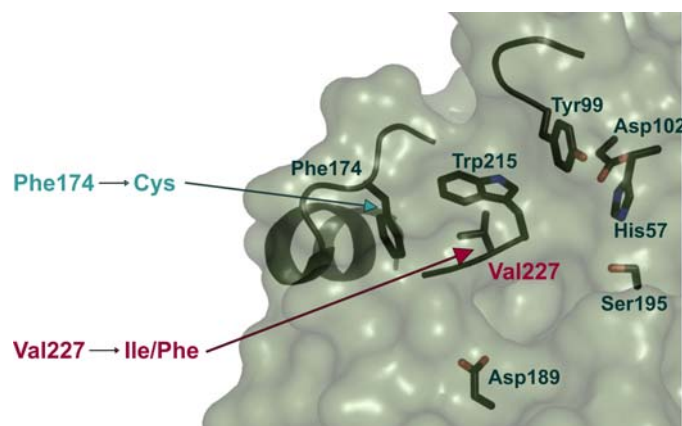


Abbildung 8 Strategie zur Steuerung der Flexibilität: Mutationen in den Positionen 174 und 227

Der Ersatz des Aminosäurerestes Phe 174 gegen Cys sollte die Einführung eines molekularen Schalters ermöglichen. Durch Bindung einer Schwermetallverbindung an das Schwefelatom des Cys sollte eine sperrige Seitenkette erzeugt werden, die nur die ‚up‘-Konformation gestattet. Als zweiter Angriffspunkt wurde das Val 227, welches unterhalb des Trp 215 lokalisiert ist, gewählt. Durch Austausch gegen Ile sollte in der *TripleSer217Ile227*-Variante und *TripleGlu217Ile227*-Variante ein voluminöserer Rest geschaffen werden, der die ‚down‘-Konformation nicht zulässt und somit die ‚up‘-Konformation favorisiert. Um diesen Effekt zu verstärken sollten Varianten mit Phe, das wiederum eine größere Seitenkette besitzt, hergestellt werden.

Die neue SSCI-Variante sollte biotechnologisch hergestellt und röntgenkristallografisch sowie enzymkinetisch untersucht werden.

1.2.5.2 Modifizierung des Inneren eines Enzyms zur Steuerung der Proteinflexibilität

Als zweiter Ansatz sollte die *TripleSer217Val227*-Variante, die nur in der ‚down‘-Konformation auftrat, und die *TripleGlu217Val227*-Variante, die sowohl in der ‚up‘- als auch in der ‚down‘-Konformation auftrat, weiter modifiziert werden. Beide Varianten entstammen den vorangegangenen Arbeiten. Auf dieser Grundlage basierend sollte versucht werden, durch Ersatz des Val 227, welches unterhalb des Trp 215 lokalisiert ist (**Abbildung 8**), die Packung des hydrophoben Kerns des Enzym zu beeinflussen. Im Faktor Xa ist der Rest 227 ein Ile; es wurde vorausgesetzt, dass eine sterische Hinderung durch sperrige, hydrophobe Seitenketten das Verbergen des Phe 174 nicht zulässt. Um diesen Effekt zu verstärken, sollte in weiteren Varianten ein Phe in Position 227 eingeführt werden, welches an dieser Stelle in der verwandten Serinproteinase Thrombin vorkommt. Bei Thrombin ist der Bereich der Reste 217 bis 225 der *active site* von großer Wichtigkeit, da dort eine Bindestelle für Natriumionen ist, die allosterisch die Aktivität der Proteinase beeinflusst. Die Bindung eines Natriumions bewirkt die Umwandlung der so genannten *slow form* in die *fast form*. (Di Cera *et al.*, 1995 ; Johnson *et al.*, 2005; Pineda *et al.*, 2006). Durch diesen allosterischen Schalter erfahren die aromatischen Reste Trp 215 und Phe 227 sowie die Disulfidbrücke Cys 168-Cys 182 eine konformelle Änderung, so dass die S2- und die Aryl-Bindetasche sterisch blockiert werden (Huntington *et al.*, 2003; Carter *et al.*, 2004).

Gemäß dieser Zielsetzung sollten Rindertrypsin-Varianten mit den Variationen in den Positionen 217 und 227 entworfen, biotechnologisch hergestellt, mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse strukturell charakterisiert und ihre Affinität zu einer Auswahl von potenten Faktor Xa-Inhibitoren (s.u., **Abbildung 13**) mit enzymkinetischen Methoden getestet werden.

1.2.5.3 Modifizierung der Enzymspezifität: Design einer Restriktions-Proteinase

Wie bereits in Kapitel 1.2.3 beschrieben, gehört die Enterokinase, welche spezifisch ihr Substrat Trypsinogen aktiviert, in dieselbe Enzymklasse wie Trypsin und Faktor Xa mit entsprechend ähnlichen strukturellen und physikochemischen Eigenschaften. Die kommerziell verfügbare Enterokinase wird aufwändig aus Kälberdärmen gewonnen. Bisher ist es nicht möglich, rekombinante Enterokinase kommerziell zu erwerben. Sie wird jedoch häufig genutzt, um Fusionsproteine an bestimmten Stellen zu spalten. So war es von Interesse, die Präferenz eines Enzyms, nämlich von Trypsin, insofern zu verändern, dass es die Spezifität der Enterokinase erhält. Der rekombinante Ursprung des Rindertrypsins sollte daher als Ausgangspunkt dienen und die Vorteile seiner relativ einfachen Gewinnung genutzt werden. Dadurch sollte ein kostengünstiges Surrogat für die Rinderenterokinase aus nicht tierischem Ursprung erhalten werden.

Die Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit bestand darin, auf der Basis des rekombinant herstellbaren Rindertrypsins eine neue, enterokinaseähnliche Trypsin-Variante zu entwerfen, biotechnologisch herzustellen und mit röntgenkristallografischen und proteinbiochemischen Methoden zu charakterisieren.

1.2.5.4 Realisierung der Arbeiten

Für die Arbeitsansätze wurde auf Plasmidkonstrukte aus den Arbeiten von Rauh *et al.*, 2004, und Reyda *et al.*, 2003, zurückgegriffen, die die Kodierung des nativen Rindertrypsins bzw. die Varianten der ersten Generation (*TripleSer217Val227*-Variante, *TripleGlu217Val227*-Variante) enthielten. Die gewünschten Varianten sollten entworfen, die erforderlichen Mutationen durch ortsgerichtete Mutagenese eingeführt, als unlösliche *inclusion bodies* in *E coli*.-Zellen exprimiert, aufgereinigt, rückgefaltet und aktiviert werden. Anschließend sollten die Varianten enzymkinetisch (Hemmkonstanten) und röntgenkristallografisch (Kristallisation, Messung, Auswertung und Verfeinerung der Kristallstrukturdaten) charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Zubehör

Gerätebezeichnung	Hersteller/Vertrieb
Äkta FPLC-Anlage mit Fraktionssammler Frac-950	Amersham Biosciences (Freiburg/Brsg.)
DNA-Sequenziergerät Li-Cor DNA 4000	MWG Biotech (Ebersberg)
Drehanoden-Röntgengenerator Micromax 007 mit konfokaler Optik	Rigaku MSC(Tokio, Japan)
Elektrophorese-Apparatur Hoefer™ SE260	Amersham Biosciences (Freiburg/Brsg.)
Elektrophorese-Apparatur Modell B1A	Owl Separation Systems (Portsmouth, USA)
Fermentationsanlage BIOSTAT® C-DCU	Braun Biotech (Melsungen)
Gefriertrocknungsanlage Modell Beta 1-16	Martin Christ (Osterode)
Hochdruckhomogenisator Gaulin Micron Lab40	APV (Lübeck)
Imageplate-System R-Axis IV ⁺⁺	Rigaku MSC (Tokio, Japan)
Kühlzentrifugen Avanti J-20, J-25 und J-30i	Beckmann (München)
Microplatereader VERSAMax	Molecular Devices (Sunnyvale, USA)
Peristaltik-Pumpe SP-GUV mit Kassettensystem	Pall Filtron (Dreieich)
Rotoren JLA 30.50, JA-10, JLA 8.1000	Beckmann (München)
Rückfaltungsreaktor, 2l mit Rührblatt und Peristaltik-Pumpe	FairManTec (Göttingen)
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
UV/Vis-Spektrometer Ultrospec 4000	PharmaciaBiotech (Freiburg/Brsg.)

Säulenmaterialien	Hersteller/Vertrieb
NHS-Sepharose	Amersham Biosciences (Freiburg/Brsg.)
Nickel-NTA-Sepharose fast flow	Amersham Biosciences (Freiburg/Brsg.)
SBTI-Agarose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

Sonstiges	Hersteller/Vertrieb
Amicon Ultra 15, MWCO 5 kDa	Millipore (Molsheim, Frankreich)

Sonstiges	Hersteller/Vertrieb
Bayosan Silikonpaste, mittelviskos	Jena Bioscience GmbH (Jena)
Crossflow Membrankassette, 10kDa	Pall Filtron (Dreieich)
Deckgläschen, rund, 22 mm	Roth (Karlsruhe)
Linbro® plates	Jena Bioscience GmbH (Jena)
Spectrapor Dialyseschläuche	Roth (Karlsruhe)
Sterilfilter mit PVDF-Membran, 0.22µm	Roth (Karlsruhe)
ZipTip _{C4} Pipettenspitzen	Millipore (Molsheim, Frankreich)

2.2 Chemikalien, Enzyme, Kits

Chemikalien	Bezugsquelle
Benzamidin (Inhibitor (1))	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glutathion, oxidiert	Roche Diagnostics (Penzberg)
Glutathion, reduziert	ICN (Meckenheim)
Inhibitoren (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9)	Dr. Jörg Stürzebecher, (Erfurt/Jena)
Inhibitor (6)	Hans-Dieter Gerber, Arbeitsgruppe Prof. Klebe (Marburg)
Pefachrome tPA® (Methylsulfonyl-cyclohexylalanyl-glycyl-arginyl- <i>p</i> -nitroanilid)	Pentapharm AG (Basel, Schweiz)
Pefachrome FXa® (Methyloxycarbonyl-cyclohexylalanyl- glycyl-arginyl- <i>p</i> -nitroanilid)	Pentapharm AG (Basel, Schweiz)

Enzyme	Bezugsquelle
Restriktionsendonuklease Bam HI	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
Restriktionsendonuklease Nde I	New England Biolabs (Frankfurt/M.)
Enterokinase	Roche Diagnostics (Penzberg)

Kits	Bezugsquelle
SequiTherm Excel II LongRead DNA Sequencing Kit	Epicentre Technologies (Madison, USA)
Qiagen HiSpeed Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
QuickChange® Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (La Jolla, USA)

Sämtliche Chemikalien entsprachen, sofern nicht anders vermerkt, dem Reinheitsgrad p.a. Gängige Substanzen und Nährmedien, die hier nicht aufgeführt sind, wurden von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Merck, ICN oder Applichem bezogen. Die Herstellung von wässrigen Lösungen erfolgte mit zweifach gereinigtem Wasser (Aqua bidest.).

2.3 Bakterien, Vektoren, Oligonukleotide

Bakterienstämme	Bezugsquelle
<i>E.coli</i> BL21 DE 3 Gold	Novagen (Bad Soden)
<i>E.coli</i> BL21 DE3 pLysS	Novagen (Bad Soden)
<i>E.coli</i> XL2	Novagen (Bad Soden)

Plasmide

Beim Vektor pET3a handelt es sich um einen Expressionsvektor des pET Systems (Novagen). Er umfasst 4640 Basenpaare und trägt den Replikationsursprung sowie das Ampicillin-Resistenzgen aus pBR32. Der Vektor enthält das *lacI*-Repressorgen in Kombination mit dem starken Promotor des Bakteriophagen T7 und dem *lac*-Operator. Rekombinante pET3a-Vektoren werden zur Expression auf einen Wirtstamm übertragen, der eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase unter der Kontrolle des *lacUV5*-Promotors trägt (*E.coli* BL21(DE3)).

Für die Versuche wurde auf einen pET3a-Vektor zurückgegriffen, der einen N-terminalen, 6-fachen Histidin-Tag enthält, gefolgt von einer Linker-Sequenz, der Enterokinaseschnittstelle und der Sequenz für Rindertrypsinogen (n-MHHHHHHH-FPV-DDDDK-IVGGYTC...).

Oligonukleotide

Tabelle 1 Oligonukleotide

Primer	Sequenz
Cys174	
sense	5'-GAA CAT GTT GCT GGT GAT TAT GCA TGA GGA GGC ACT TTT GCA AGA GCT-3'
anti-sense	5'-AGC TCT TGC AAA AGT GCC TCC TCA TGC ATA ATC ACC AGC AAC ATG TTC3'
Ile227	
sense	5'-CT CAC GTA GTT GCA GAC CTT TGT GTA GAT ACC AGG CTT G-3'
anti-sense	5'-C AAG CCT GGT ATC TAC ACA AAG GTC TGC AAC TAC GTG AG-3'

Primer	Sequenz
Phe227	
sense	5'- CT CAC GTA GTT GCA GAG CTT AGT GTA GAA ACC AGG CTT G -3'
anti-sense	5'-C AAG CCT GGT TTC TAC ACT AAG CTC TGC AAC TAC GTG AG-3'
KRRK	
sense	5'-CAG CAT GAT GTC GTT GTT TTT ACG ACG TTT GTT GTA GCT GGG ATG GAC-3'
anti-sense	5'-GTC CAT CCC AGC TAC AAC AAA CGT CGT AAA AAC AAC GAC ATC ATG CTG-3'
C-6His	
sense	5'-CA GCT TCC TTT CGG GCT TTA ATG GTG GTG GTG ATG GTG GTT GGA GGC GAT GGT CTG C -3'
anti-sense	5'-G CAG ACC ATC GCC TCC AAC CAC CAT CAC CAC CAC CAT TAA AGC CCG AAA GGA AGC TG-3'
T7 Promotor	5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3'
T7 Terminator	5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG G-3'

Die Planung der Oligonukleotide erfolgte mit dem Programm GeneRunner. Sie wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Die beiden T7-Primer, die für die Sequenzierung der SSCI-Variante verwendet wurden, enthielten eine IRD-800-Markierung am 5'-Ende.

2.4 Mikrobiologische Methoden

Sämtliche mikrobiologischen Arbeiten wurden unter sterilen bzw. aseptischen Bedingungen durchgeführt. Arbeitsgeräte und Materialien wurden autoklaviert oder gegebenenfalls sterilfiltriert.

2.4.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung von Bakterien, die mit großer Effizienz Plasmide aufnehmen können, so genannte kompetente Zellen, wurde eine Einzelkolonie von einem Plattenmedium in 5 ml LB-Medium ohne Antibiotikum überführt und 3 h lang bei 37°C und 250 rpm geschüttelt. Die Kultur wurde in 100 ml steriles, antibiotikafreies Medium übertragen und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 weiter inkubiert. Die Bakterien wurden 5 min bei 3000 g abzentrifugiert, das Zellpellet mit 20 ml Lösung A resuspendiert und 60 min auf Eis gelagert. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Zellmasse mit 4 ml Lösung B vermischt, in Aliquots zu je 80 µl in flüssigem Stickstoff schockartig eingefroren und bei -80°C gelagert.

Lösung A	Lösung B
30 mM Kaliumacetat	10 mM Natrium-MOPS
50 mM Manganchlorid	10 mM Natrium-MOPS
100 mM Kaliumchlorid	10 mM Natrium-MOPS
10 mM Kalziumchlorid	75 mM Kalziumchlorid
15 % Glycerol	15 % Glycerol
pH 5.8, sterilfiltriert	pH 7.0, autoklaviert

2.4.2 Transformation kompetenter *E. coli*-Zellen

Die transformationskompetenten *E. coli*-Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid-DNA gemischt und weitere 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde die Lösung für 1 min einer Temperatur von 42°C („Hitzeschock“) ausgesetzt und sofort für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 150 µl LB-Medium wurde für 60 min bei 350 rpm inkubiert. Zur Selektion der transformierten Zellen wurden 10, 50 und 100 µl der Kultur auf LB-Agar-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen und 12-18 Stunden bei 37°C bebrütet.

2.4.3 Plasmidpräparation

Da es sich beim pET 3a-Vektor um einen low copy-Vektor handelt, der nur eine geringe Anzahl an Plasmid-Kopien pro Zelle ermöglicht, wurde zur Extraktion ausreichender Mengen an Plasmid-DNA das High Speed Plasmid Purification Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Dazu wurden Vorkulturen aus Glycerol-Kulturen angesetzt und gemäß der Anleitung des Herstellers weiterverarbeitet.

Die gewonnene DNA wurde mit Aqua bidest. gelöst und ihr Gehalt durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass für eine Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA die OD₂₆₀ 1 beträgt.

2.4.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde nach Weiner *et al.*, 1994, mit Hilfe des QuickChange Site Directed Mutagenesis-Kits der Firma Stratagene (La Jolla, USA) durchgeführt. Sie erlaubt durch hintereinander ablaufende Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) einfach durchzuführende Veränderungen in der DNA wie z.B. Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen. Als Matrize dient die zu verändernde Plasmid-DNA. Die gewünschte Mutation ist in ca. 20 bis 45 Basen langen, zueinander komplementären Oligonukleotiden enthalten, die bis auf die zu mutierende Stelle in der Plasmid-DNA zu dieser wiederum

komplementär sind. Durch mehrere PCR-Zyklen wird ein Vielfaches an veränderter DNA erzeugt. Anschließend wird die Matrizen-DNA spezifisch durch die Restriktionsendonuklease Dpn I verdaut.

2.4.5 Verdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für die Analyse der DNA wurde diese durch Restriktionsendonukleasen teilweise abgebaut. Dabei wurde die Insertion mit der für das Protein kodierenden Sequenz herausgeschnitten. In einem Doppelverdau wurden ca. 2 µg DNA gleichzeitig mit den Restriktionsendonukleasen Bam H I und Nde I, die jeweils vor und hinter der Insertion die Schnittstellen erkennen, 2 Stunden lang bei 37°C verdaut.

2.4.6 Agarose-Gelelektrophorese

Molekülgemische können aufgrund ihrer unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld durch Gelelektrophorese getrennt werden. Durch Vergleich mit Fragmenten bekannter Länge (Molekulargewichtsstandard) kann ihre Größe bestimmt werden. Für die DNA-Gelelektrophorese wurde eine Horizontalgel-Apparatur der Firma Owl Separation Systems benutzt. 1 % Agarose wurde in TAE-Laufpuffer nach Aufkochen gelöst und in die Apparatur gegossen. Nach dem Erstarren wurden die zu analysierenden Proben mit einem Viertel ihres Volumens mit Probenpuffer (Schimpf *et al.*, 2002) versetzt, in die Taschen einpipettiert und bei einer Spannung von 80 V laufen gelassen. Zur Detektion wurde das Gel in 0.01 % Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Anschließend wurde unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm durch die Fluoreszenz des interkalierenden Ethidiumbromids die Position der Banden bestimmt.

TAE-Laufpuffer	Probenauftragspuffer
40 mM Tris	50 % (v/v) Glycerol
20 mM Essigsäure	0.2 % (w/v) Natrium-Dodecylsulfat
2 mM EDTA	0.05 % (w/v) Bromphenolblau
pH 8.3	in TAE-Puffer

2.4.7 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenz für die SSCI-Trypsin-Variante wurde im eigenen Institut ermittelt, alle anderen Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, durchgeführt.

Die Sequenzbestimmung der DNA der SSCI-Variante erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) unter der Verwendung des SequiTherm Excel II LongRead DNA Sequencing Kits. Alle Reaktionen sowie die anschließende

Auftrennung wurden analog den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Als Primer wurden fluoreszenzmarkierte T7-Promoter- und T7-Terminator-Primer verwendet. Die Analyse und Auswertung erfolgte mit einem Li-Cor DNA 4000 DNA-Sequenzierer und erlaubte eine Leseweite von bis zu 700 bp pro Ansatz.

2.4.8 Flüssigkulturen

Autoklaviertes LB-Medium wurde, gegebenenfalls nach Zugabe von Ampicillin und Chloramphenicol, von einer Plattenkultur, aus einer Glycerinkultur oder Flüssigkultur angeimpft und unter Schütteln bei 37°C im Erlenmeyerkolben inkubiert. Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0.6 durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet.

LB-Medium
10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g Natriumchlorid
zu 1 l in Aqua dem. lösen

Die benötigten Antibiotika wurden in Form von Stammlösungen (1000 fach) den autoklavierten und auf unter 55°C abgekühlten Medien in folgenden Endkonzentrationen zugesetzt:

Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml (ethanolische Stammlösung)

Für die Induktion der Proteinbiosynthese wurde IPTG ebenfalls als Stammlösung (1000 fach) in einer Endkonzentration von 1 mM hinzugefügt.

2.4.9 Plattenkulturen

Für die Kulturen in Petrischalen wurde LB-Medium mit 1.5 % Agar versetzt und autoklaviert. Nach Abkühlen und Zugabe der Antibiotika wurde das Medium in sterile Petri-Schalen gegossen. Die Platten wurden bei 4°C gelagert. Zum Ausplattieren wurden 10-100 µl Kultur mit einem Drygalski-Spatel ausgestrichen. Für das Animpfen aus Glycerinkulturen wurde eine Impföse benutzt. Die Platten wurden 12-18 Stunden bei 37°C bebrütet.

2.4.10 Fermentation von *E. coli*

Um größere Mengen an Protein der *TripleGlu217Phe227*-Variante zu erhalten wurde diese Variante in einem 10 l-Fermenter kultiviert. Als Vorkultur dienten 200 ml Medium, die über Nacht in einem 1 l-Erlenmeyerkolben mit Schikanen angezogen wurden. Die Kultur wurde abzentrifugiert (10 min, 5000 g), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 ml sterilem Medium resuspendiert. Im Fermenter wurden 4 l Hefeextrakt-Medium autoklaviert. Unter sterilen Bedingungen wurden über Einfüllstutzen je 500 ml sterile Glucose-, Dikaliumhydrogenphosphat- und Magnesiumsulfat-Lösung hinzugegeben. Die Fermentation wurde nach Hinzufügen von Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) mit der resuspendierten Vorkultur gestartet. Der pH-Wert wurde durch automatische Titration von Natriumhydroxid-Lösung 10 % (w/w) bzw. Phosphorsäure 10 % (w/w) auf 7.0 gehalten. Zusätzlich wurde der Fermentationsansatz gründlich gerührt (1200 rpm) und mit gefilterter Raumluft belüftet. Nachdem bei einer OD₆₀₀ von 12 die vorgelegte Glucose aufgebraucht war, wurde kontinuierlich Feeding-Lösung mit einer Flussrate von 12 ml/min hinzugegeben. Die Proteinexpression wurde bei einer OD₆₀₀ von 36 mit 1 mM IPTG gestartet. Nach 3.5 Stunden Expressionszeit wurde geerntet.

Hefeextrakt-Medium	6 % Glucose-Lösung	Feeding-Lösung
300 g Hefeextrakt 3 g Ammoniumchlorid	75 mM Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung	300 g Hefeextrakt 250 g Glycerol 87 %
zu 4 l mit Aqua bidest. lösen	70 mM Magnesiumsulfat-Lösung	zu 1 l mit Aqua bidest. lösen
	10 % Natriumhydroxid-Lösung	
	10 % Phosphorsäure	

2.4.11 Zellernte

Die Bakterien-Kulturen wurden zentrifugiert (15 min, 5000 g), die Überstände entsorgt und die Zellpellets weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert.

2.4.12 Aufbewahrung von Bakterien

Kulturen, die zur Weiterverarbeitung bestimmt waren, wurden bei -20°C gelagert. Die langfristige Aufbewahrung von Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen. Hierzu wurde die Flüssigkultur mit einem Viertel ihres Volumens mit Glycerol 87 % (w/w) gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.5 Proteinbiochemische und biophysikalische Methoden

2.5.1 Proteinpräparation

Alle Trypsin-Varianten wurden als Trypsinogen überexprimiert und fielen als unlösliches Protein in Form von *inclusion bodies* an.

2.5.2 *Inclusion Body*-Reinigung

Die *inclusion body*-Isolierung und -Solubilisierung erfolgte nach Vorschriften von Rudolph *et al.*, 1996, Protokolle 3 und 4.

2.5.3 Rückfaltung

Das nach der *inclusion body*-Reinigung erhaltene, denaturierte Protein wurde nach modifizierten Vorschriften von Rudolph *et al.*, 1996 und Rauh *et al.*, 2002, in einem Rückfaltungsreaktor bei 7°C durch Puls-Renaturierung in Arginin-Puffer rückgefaltet. Dazu wurden die solubilisierten *inclusion bodies* auf eine Konzentration von 4 mg/ml eingestellt und in 10 Pulsen (20 mg *inclusion bodies* innerhalb von 5 min) alle 12 Stunden bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml in den Arginin-Puffer unter Rühren eingetropft. Nach Abschluss der Rückfaltung wurde der Ansatz mit einer Cross-Flow-Filtrationseinheit (MWCO 10kDa) auf ein Zehntel konzentriert und anschließend gegen Tris-Acetat-Puffer dialysiert. Angefallene Aggregate wurden durch Zentrifugieren oder Filtrieren entfernt.

Arginin-Puffer	Tris-Acetat-Puffer
0.1 M Tris	0.05 M Tris
1 M Arginin	0.05 M Natriumacetat
0.1 M Borsäure	0.5 M Essigsäure
60 mM Kalziumchlorid	0.02 M Kalziumchlorid
3 mM reduziertes Glutathion	pH 4.5
pH 8.5	

2.5.4 Aktivierung

Das renaturierte Trypsinogen wurde vorsichtig auf pH 6.5 titriert und durch Zugabe von Enterokinase bei Raumtemperatur aktiviert. In einem Plattenlesegerät wurde die Trypsinaktivität gegenüber des chromophoren Substrats Pefachrome tPA® gemessen. Die Umsetzung erzeugte das gelbe, bei einer Wellenlänge von 405 nm absorbierende *p*-Nitroanilin. Die errechnete Steigung der zeitlich gemessenen Absorptionskurve diente

dabei als Maß für die Aktivität des Renaturierungsansatzes bzw. für die relative Menge an korrekt gefaltetem Trypsin. Der Aktivierungsansatz wurde solange bei Raumtemperatur vorsichtig gerührt, bis die Aktivität ihr Maximum erreicht hatte.

2.5.5 Affinitätschromatografische Reinigung

Mit der Affinitätschromatographie lassen sich Proteine aufgrund reversibler Interaktionen zwischen dem zu reinigenden Protein und einem spezifischen Liganden, der an das Säulenmaterial gebunden ist, mit hoher Kapazität, hoher Selektivität und daher hoher Auflösung auftrennen. Es wurde mit einem Chromatografiegerät Äkta FPLC der Firma Amersham Biosciences gearbeitet.

2.5.5.1 Reinigung an SBTI-Agarose

Für die Reinigung der aktivierten Trypsin-Varianten wurde eine XK 16-Säule mit kommerzieller SBTI-Agarose gepackt. Mit Hilfe einer 50 ml-Probenauftragsschleife wurde das aktivierte Trypsin auf die mit Puffer I equilibrierte Säule aufgetragen und anschließend mit Puffer II gewaschen. Durch einen pH-Wechsel mit 0.1 M Ameisensäure eluierte das gebundene Trypsin. Nach der Dialyse gegen 10 mM Kalziumchlorid in 1 mM Salzsäure wurde die Konzentration an reinem Trypsin photometrisch bestimmt.

Puffer I	Puffer II
0.05 M Tris	0.05 M Tris
0.02 M Kalziumchlorid	0.02 M Kalziumchlorid
pH 6.5	0.5 M Natriumchlorid
	pH 6.5

2.5.5.2 Reinigung an Nickel-NTA-Sepharose

Zunächst wurde das NTA-Sepharose-Material gemäß den Herstellerangaben mit Nickelionen beladen und in eine XK 16-Säule gepackt. Die vorbereitete Probe wurde mit Hilfe einer 50 ml-Probenauftragsschleife auf die Säule aufgetragen und über den Histidin-Tag an das Säulenmaterial gebunden. Durch Waschen mit Puffer III wurde unspezifisch gebundenes Protein entfernt und anschließend mit Puffer IV eluiert.

Puffer III	Puffer IV
50 mM Natriumacetat	50 mM Natriumacetat
50 mM Essigsäure	50 mM Essigsäure
0.3 M Natriumchlorid	0.3 M Natriumchlorid
20 mM Kalziumchlorid	20 mM Kalziumchlorid
pH 6.5	0.5 M Imidazol
	pH 4.0

2.5.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Absorptionssmessungen werden zur schnellen Konzentrationsbestimmung von Proteinen benutzt. In vielen Fällen kann auch die Reinheit der Lösung anhand eines Absorptionsspektrums abgeschätzt werden. Gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz ist das Ausmaß der Extinktion **E** der elektromagnetischen Strahlung proportional zur Konzentration **c** der absorbierenden Substanz, zur durchlaufenen Schichtdicke **d** und zu einem Proportionalitätsfaktor **ε**, den man als molaren Absorptionskoeffizienten bezeichnet

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon$$

Der zur Berechnung der Proteinkonzentration verwendete spezifische Extinktionskoeffizient von Trypsin beträgt 1.3 ml/(mg·cm). Als Faustregel für Proteinlösungen heterogener Zusammensetzung gilt der Zusammenhang 1 OD₂₈₀ = 1 mg/ml.

2.5.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Analyse von Proteingemischen wurde die diskontinuierliche Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli, 1970, durchgeführt. Die hitzedenaturierten, reduzierten und durch Natriumdodecylsulfat (SDS) stark negativ geladenen Proteine werden in einer Polyacrylamidgelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes ihrer Größe nach getrennt.

Es wurden Gele (Größe: 100 x 105 x 0.75 mm) mit einem Trenngel 15 % Acrylamid und Sammelgel 6 % Acrylamid angefertigt. Nach dem Erhitzen der Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 3:1 für 5 min bei 95°C wurden die Proteine bei einer Spannung von 130 V bzw. 30 mA pro Gel in einer Vertikalgelapparatur getrennt.

Probenpuffer	Laufpuffer nach Laemmli
15 % (w/w) Glycerol	144 g Glycin
5 % (w/v) Natriumdodecylsulfat	30 g Tris
5 % (w/w) β -Mercaptoethanol	10 g Natriumdodecylsulfat
0.05 % (w/v) Bromphenolblau	zu 1 l mit Aqua bidest. lösen
in 1 M Tris pH 6.8	pH 8.9

2.5.8 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Coomassie Brilliant Blau R250 ist ein Farbstoff, der als tiefblauer Komplex unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0.1-2 μ g Protein pro Bande. Die Färbung wurde nach dem Protokoll nach Fairbanks, 1971, durchgeführt. Dazu wurde das Gel nacheinander jeweils 15 min in den Lösungen A, B und C geschwenkt und später in Lösung D entfärbt, bis die Banden deutlich sichtbar waren.

Fairbanks-Lösung A	Fairbanks-Lösung B	Fairbanks-Lösung C	Fairbanks-Lösung D
25 % (v/v) Isopropanol	10 % (v/v) Isopropanol	10% (w/v) Essigsäure	10 % (w/v) Essigsäure
10 % (w/v) Essigsäure	10 % (w/v) Essigsäure	0.05% (w/v) Brilliant Blau R250	
0.05 % (w/v) Brilliant Blau R250	0.05 % (w/v) Brilliant Blau R250		

2.5.9 Bestimmung der Inhibitionskonstanten

Die Messungen wurden in einem Plattenlesegerät VERSAMax der Firma Molecular Devices bei 25°C durchgeführt. Die Testlösung setzte sich wie folgt zusammen: 200 μ l ethanolischer Tris-Puffer, 25 μ l wässrige Substratlösung und 50 μ l Enzymlösung. Vom Substrat Pefachrome® tPA wurden zwei unterschiedliche, von den Inhibitoren fünf unterschiedliche Konzentrationen eingesetzt. Drei Minuten nach Zugabe des Enzyms wurde die Reaktion durch 25 μ l Essigsäure 50 % (v/v) abgestoppt und die OD bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen. Die K_i -Werte wurden nach Dixon, 1972, durch lineare Regression berechnet und sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen.

Ethanolischer Tris-Puffer
50 mM Tris
154 mM Natriumchlorid
5 % (w/v) Ethanol
10 mM Kalziumchlorid
pH 8.0

2.5.10 Bestimmung Kinetischer Parameter

Die Ermittlung der K_m - und k_{cat} -Werte erfolgte in Zusammenarbeit mit der Gruppe von Dr. Jörg Stürzebecher, Erfurt/Jena. Unter Verwendung der chromogenen Substrate Pefachrome F Xa® and Pefachrome tPA®, Pentapharm, Basel, und des fluorogenen Substrats Guanidinobenzoessäure-*p*-methyl-umbelliferylester wurden für die Varianten Michaelis-Menten-Kinetiken gemessen und *active site*-Titrationsen durchgeführt.

2.5.11 Massenspektrometrie

Zuvor wurden die Proben mit Hilfe von ZipTip_{C4}-Pipetten-Spitzen der Firma Millipore für die massenspektrometrische Analyse entsalzt.

Die Spektren wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle, erstellt und ausgewertet. Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) wurden an einem Esquire-LC-Ionenfallen-Massenspektrometer (Bruker Analytik, Bremen) aufgenommen. MALDI-TOF-Massenspektren wurden an einem REFLEX Spektrometer (Bruker Analytik, Bremen) aufgenommen.

2.5.12 Gefriertrocknung

Zur längerfristigen Lagerung der Trypsin-Varianten wurden die konzentrierten Proben einer Gefriertrocknung unterzogen. Zunächst wurden Aliquote zu 2 mg bei -80°C in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend im Gefriertrockner bei einer Arbeitstemperatur von 22°C über 16 Stunden lyophilisiert. Das erhaltene Trocknungsgut wurde bei -20°C gelagert. Es ließ sich in Wasser leicht wieder lösen und zeigte danach die gleiche Aktivität wie vor der Trocknung.

2.6 Röntgenkristallografie - Theorie

Um zelluläre Prozesse im Detail bis hin zur atomaren Auflösung verstehen zu können, ist oft die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur entscheidend. Neben der NMR-Spektroskopie (nuklearmagnetische Resonanz-Spektroskopie), bei der meistens gelöste Stoffe vermessen werden, wird bei der Röntgenstrukturanalyse kristallines Protein untersucht.

Seit den Pionierarbeiten von Perutz und Kendrew und ihrer Strukturaufklärung des Myoglobins (Kendrew *et al.*, 1957), für welche sie 1962 mit dem Nobel-Preis in Chemie ausgezeichnet wurden, ist die Zahl der mit Röntgenstrukturanalyse bestimmten Strukturen besonders in den letzten Jahren sehr rasch angestiegen. Dies wurde neben der Entwicklung immer neuerer Techniken in der Molekularbiologie und Proteintechnologie ermöglicht, so dass ausreichend große Mengen der gewünschten Proteine verfügbar sind. Zusätzlich wurden sowohl leistungsstarke Strahlungsquellen (Synchrotron-Strahlung) und Detektoren als auch leistungsfähigere Computer und anwenderfreundliche Programme entwickelt.

Zudem hat die Röntgenstrukturanalyse eine große Bedeutung für die Molekularbiologie erlangt, indem sie auf geeignete Positionen für eine ortsgerichtete Mutagenese hinweisen kann. Heute sind nicht nur die akademischen Einrichtungen, sondern auch die pharmazeutische Industrie wegen ihres Interesses an der Veränderung von Proteinen und der Möglichkeit der strukturbasierten Entwicklung von Arzneistoffen im Bereich der Strukturaufklärung tätig.

Die folgenden Kapitel 2.6.1 bis 2.6.6 sind größtenteils Übersetzungen von Stubbs, 2006.

2.6.1 Kristallisation

Die Voraussetzung für die Bestimmung einer Makromolekül-Struktur durch Röntgenstrukturanalyse besteht darin, Kristalle von ausreichender Größe und Qualität zu erhalten. Der Vorgang der Kristallisation ist immer noch der am wenigsten verstandene Vorgang und für z.B. unbekannte, neue Proteine gänzlich unvorhersagbar. Sind allerdings einmal Kristalle von guter Qualität vorhanden, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass die Struktur des Proteins bestimmt werden kann. Dabei bestehen hohe Anforderungen an das Protein und die Kristallisationspuffer in Bezug auf Homogenität und Reinheit. Ein Ausfällen des Proteins wird erreicht, indem die proteinenthaltende Lösung langsam zur Übersättigung gebracht wird. Dies kann durch Zugabe von Salz („Aussalzen“) oder von wasserziehenden Agenzien (Polyethylenglycole, Ammoniumsulfat), die u. a. im Kristallisationspuffer enthalten sind, erzielt werden. Es können verschiedene Methoden angewendet werden, wie z.B. die Kristallisation durch Dampfdiffusion (Bauer *et al.*, 1999), im Microbatch-Ansatz (Durcruix *et al.*, 1992) oder im schwimmenden Tropfen (Lorber, *et al.*, 1996).

Das Konzept der Einheitszelle stellt ein mathematisches Modell dar, das den Kristall in identische Komponenten unterteilt, so dass nur wenige Parameter notwendig sind, um die Anordnung der Moleküle zu beschreiben. Demzufolge reduziert sich die Aufgabe, die Struktur eines gesamten Kristalls zu bestimmen, auf die Struktur der Einheitszelle. Je kleiner ein Molekül ist, desto kleiner kann die Einheitszelle sein und desto mehr Einheitszellen liegen in einem Kristall gegebener Größe vor. Diese Tatsache erklärt zum Teil die im Allgemeinen höhere Intensität der Röntgendiffraktionseigenschaften bei Kristallen kleinerer Moleküle (z.B. Salzkristalle). Setzt man die Einheitszellen in Richtung der Zellachsen aneinander, was man als Kristallgitter bezeichnet, erhält man einen perfekten, makroskopischen Kristall. Im einfachsten Fall besteht die Einheitszelle aus einer einzigen molekularen Einheit. Öfter jedoch enthalten Einheitszellen von Kristallen mehrere Molekülkopien. Sind diese Kopien so arrangiert, dass Rotationen, Translationen oder Inversionen der Einheitszelle eine Überlagerung mit den Original-Koordinaten erlauben, handelt es sich um eine höhere Symmetrie. Die Einheitszelle umfasst dann mehrere asymmetrische Einheiten, aus denen die Einheitszelle, und schließlich der gesamte Kristall, durch mathematische Symmetrieoperationen rekonstruiert werden kann. Abgesehen von der Identitätsoperation (C_1 , Drehung um 360°) sind für kristallografische Achsen nur zwei-, drei-, vier- oder sechsfache Rotationsachsen zulässig. Enthält die asymmetrische Einheit mehr als eine identische Kopie von Molekülen, spricht man von nicht-kristallografischer Symmetrie (NCS) zwischen den Untereinheiten. Zusätzlich zu den Rotationssymmetrien sind im Kristallgitter auch Schraubenachsen, Gleitebenen und Zellzentrierungen erlaubt.

Proteine haben durch ihre polyvalente Oberfläche sehr viele verschiedene Anordnungsmöglichkeiten mit nur geringen energetischen Unterschieden, so dass die vollständige, reguläre Anordnung von Proteinen im Kristall wenig wahrscheinlich ist. Diese unterschiedlichen Anordnungsmöglichkeiten äußern sich makroskopisch in polymorphen Kristallformen und in der Existenz unterschiedlicher Elementarzellen bei einzelnen Proteinspezies, wie später im Ergebnisteil dargestellt wird.

Proteinkristalle zeigen im Gegensatz zu Kristallen kleinerer Moleküle einen wesentlich lockereren Zusammenhalt und sind dadurch leicht zerbrechlich. Sie besitzen einen Lösungsmittelanteil von 30 %-80 %. Im Kristall sind die Proteinmoleküle von einer Solvatationshülle umgeben, die teilweise geordnet ist, während die Solvatationskanäle, die durch die Packung der Proteinmoleküle im Kristall entstehen, mit Kristallisationspuffer gefüllt sind.

2.6.3 Beugung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Wie Max von Laue in einem Experiment gezeigt hatte (Nobelpreis für Physik, 1914), sind Röntgenstrahlen elektromagnetische Wellen mit hoher Energie bzw. mit kurzer

Wellenlänge. Wellen sind durch ihre *Frequenz*, ihre *Amplitude* und ihre *Phase* charakterisiert, jeweils wichtige Begriffe für die Grundlagen der Röntgenkristallografie.

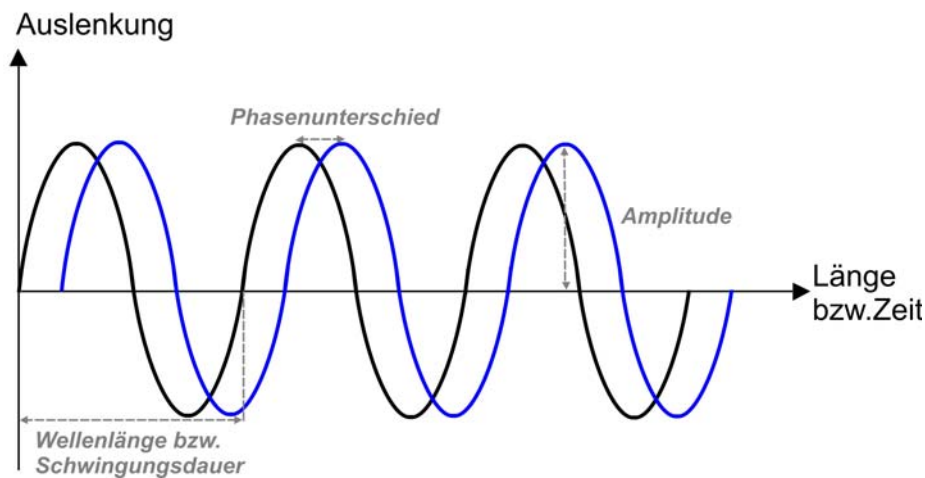


Abbildung 10 Amplitude, Phase und Wellenlänge

Die Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Wellen. Generell werden Wellen durch zwei Größen charakterisiert, durch die Amplitude und durch die Phase. Die Amplitude ist die maximale mögliche Auslenkung der Welle. Sie ist bei Wellen eine vektorielle Größe, da neben der Stärke der Auslenkung auch deren Richtung entscheidend ist. Die Phase einer Welle gibt an, in welchem Abschnitt (innerhalb einer Periode) sich die Welle zu einem bestimmten Zeitpunkt und einem bestimmten Ort befindet. Als Wellenlänge wird der kleinste Abstand zweier Punkte gleicher Phase einer Welle bezeichnet (Abb. nach Rhodes, 2000).

Trifft ein Röntgen-Photon auf ein Elektron, so beginnt dieses zu oszillieren und fungiert dadurch als sekundäre Röntgenquelle. Die sich ergebenden Wellen breiten sich mit derselben Wellenlänge wie die der ankommenden Welle radial vom Oszillationszentrum aus, aber mit einer der Streukraft des Elektrons korrespondierenden Amplitude und einer Phasenverschiebung von 180° . Ein zweites Elektron in unmittelbarer Umgebung erzeugt dieselbe Streuung, aber aufgrund seiner anderen Position eine andere Phasenverschiebung im Vergleich zum ersten Elektron. Platziert man einen Detektor mit bestimmtem Abstand hinter dem Objekt, nimmt dieser die Summe der individuell gestreuten Wellen als resultierendes Diffraktions- bzw. Streumuster auf. Abhängig von den unterschiedlichen Phasen ist die Amplitude als Funktion der Position entlang des Detektors moduliert. Natürlicherweise liegen die Elektronen in Makromolekülen nicht isoliert, sondern mit Atomen und Bindungen assoziiert vor. In der Kristallografie von Biomolekülen setzt man voraus, dass die Ladungsverteilung um den Atomkern lokalisiert ist; in diesem Fall ist die Streuung aufgrund individueller Elektronen durch Elektronendichteverteilungen ersetzt. Durch Lösung der Schrödinger-Gleichung ist es möglich, bei gegebener Wellenlänge die Elektronendichteverteilung und dadurch den Grad der Streuung der einzelnen Atome abzuleiten (der so genannte *Streu- bzw. Form-Faktor*). Der Form-Faktor nimmt mit steigendem Diffraktionswinkel ab; die maximale Streuung tritt in der Vorwärtsrichtung (d.h. ungebeugte Wellen) auf und ist direkt proportional zur Ordnungszahl **Z** des streuenden Atoms. Dies täuscht über das Hauptproblem der Röntgenkristallografie hinweg: Biomoleküle bestehen überwiegend aus Atomen mit

geringer Elektronendichte (Wasser-, Kohlen-, Stick- und Sauerstoff mit $Z = 1, 6, 7$ bzw. 8) und streuen Röntgenstrahlen nur schwach. Dazu kommt die Tatsache, dass Atome in Bewegung sind. Diese Bewegung führt zu einer exponentiellen Abnahme der Intensitäten bei höheren Diffraktionswinkeln und folglich zu einer geringeren Auflösung der Daten. Das Ausmaß der Abschwächung des Form-Faktors ist durch den Temperatur- bzw. B-Faktor bestimmt - je höher der B-Faktor, desto schneller der Abfall der Intensität mit dem Streuwinkel.

Die Summe der gestreuten Wellen durch jedes Atom eines Objektes resultiert in einem definierten Diffraktionsmuster. Mathematisch gesehen ist das Diffraktionsmuster eine Fourier-Transformation des streuenden Objekts; jede Richtung innerhalb des Diffraktionsmusters ist mit einer Amplitude F und einer Phase Φ verknüpft. Hat man eine Elektronendichteverteilung $\rho(\mathbf{r})$, dann ist der Streufaktor F in gegebener Richtung θ gegeben durch

$$F(\mathbf{S}) = \int \rho(\mathbf{r}) \exp \{2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}\} d^3 \mathbf{r} \quad (\text{Gleichung 1}),$$

wobei die Größe des Diffraktionsvektors $|\mathbf{S}| = 2 \sin \theta / \lambda$ ist. Eine Besonderheit der Fourier-Transformation ist die Möglichkeit ihrer Umkehrung. Die Elektronendichte ist einfach gegeben durch die umgekehrte Fourier-Transformation:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int F(\mathbf{S}) \exp \{2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}\} d^3 \mathbf{S} \quad (\text{Gleichung 1a})$$

Hierbei ist zu beachten, dass F eine Vektorgröße mit Betrag und Phase ist.

Das Phänomen der Streuung ist nicht nur auf Röntgenstrahlung beschränkt. Dasselbe gilt z.B. für sichtbares Licht. Mit diesem ist es möglich, die gestreuten Wellen zu einem Bild des streuenden Objektes zusammenzufügen. Dies erreicht man mit Linsen, die dafür sorgen, dass sowohl die Phasen- als auch die Amplituden-Information, die im Streumuster enthalten sind, erhalten und wieder zu einem Bild zusammengefügt werden können. Für Röntgenstrahlung jedoch existieren keine geeigneten Linsen. Im Prinzip kann durch die Fourier-Transformation ein Bild rekonstruiert werden, wenn die Phasen von jedem Teil des Diffraktionsmusters bekannt sind. Gegenwärtig können aus Streuexperimenten sehr genau die Intensitäten und somit die Amplituden gemessen werden, die gesamte Phaseninformation geht aber leider verloren.

Wenn die Information der Atomkoordinaten innerhalb eines Moleküls, d.h. die Struktur, bekannt ist, können sie benutzt werden, um die Amplituden, Phasen und Intensitäten komplett zu rekonstruieren. Das Fehlen der Phaseninformation bedeutet, dass der umgekehrte Prozess nicht direkt möglich ist. Es ist daher die Hauptaufgabe eines

Kristallografen, die Phasen zu bestimmen, oder mit anderen Worten, das Phasenproblem zu lösen.

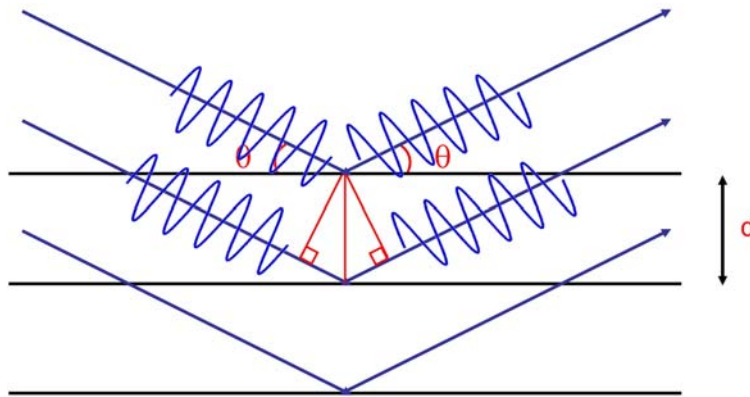


Abbildung 11 Bragg-Ebenen

Bragg beschrieb die Streuung von Strahlung an einem Kristall grafisch als Reflexion an Ebenen. Jeder reflektierte Strahl wird als ein Bragg-Reflex von einer Kristallgitterebene betrachtet, wobei der dem Einfallswinkel komplementäre Winkel θ als Glanzwinkel bezeichnet wird ($= 90^\circ - \text{Einfallswinkel}$). Wenn die reflektierten Wellen in Phase sind, tritt konstruktive Interferenz auf, welche als Reflex detektierbar ist (Abb. nach Stubbs, 2006).

Eine spezielle Situation liegt vor, wenn das Objekt ein Kristall ist. Unter geeigneten Bedingungen, d.h. wenn alle Einheitszellen eines Kristalls in Phase streuen, kommt es zu einer erheblichen Verstärkung der Streuung, so dass individuelle Reflexe gemessen werden können. Zwar physikalisch nicht ganz korrekt veranschaulichten William Henry Bragg und sein Sohn William Lawrence Bragg die Streuung an einem Kristall grafisch (**Abbildung 11**). Sie nahmen an, dass die an einem Kristall gestreute Strahlung sich so verhält, als werde sie an imaginären Ebenen des Kristalls reflektiert. Daher werden die Punkte im Diffraktionsmuster als Reflexionen bezeichnet. Jeder gestreute Strahl wird als ein Bragg-Reflex von einer Kristallgitterebene betrachtet, wobei der Einfallswinkel $90^\circ -$

Glanzwinkel θ gleich dem Ausfallswinkel ist. Damit eine konstruktive Interferenz der Wellen auftritt und es zu einem Reflex auf dem Detektor kommt, müssen die reflektierten Wellen in Phase sein. Bragg stellte die These auf, dass für eine Wellenlänge λ , für einen Einfallswinkel ($90^\circ - \text{Glanzwinkel } \theta$) und ein Ebenenabstand d nur dann konstruktive Interferenz auftritt, wenn gilt:

$$n \lambda = 2 d \sin \theta \quad (\text{Gleichung 2, Bragg'sches Gesetz})$$

wobei n eine ganze Zahl ist. Bei allen übrigen Werten für n führt die Vielzahl der Kristallgitterebenen zu einer Auslöschung der gestreuten Strahlung. Sind die schwächsten Reflexe eines Streubildes bei einem Winkel von $2 \theta_{\max}$ zu sehen, so definiert man dies als den minimalen Abstand $d_{\min} = \lambda / \sin \theta_{\max}$, der von diesem Kristall aufgelöst werden kann. Dies nennt man die Auflösung von Röntgendiffraktionsdaten. Die Auflösung von Röntgendiffraktionsdaten ist eine Funktion eines Kristalls. Schlecht geordnete Kristalle

zeigen ein geringes Streuvermögen. Man spricht von einer schwachen Auflösung von Röntgendiffraktionsdaten bei Werten größer 3 Å, einer mittleren Auflösung zwischen 3 Å und 1.5 Å. Darunter liegende Auflösungen können so genau sein, dass Unterschiede zwischen Kohlenstoff-, Stickstoff- und Sauerstoffatomen oder gar Wasserstoffatome sichtbar werden.

Eine weitere Folgerung des Bragg'schen Gesetzes ist der Begriff des reziproken Gitters. Durch die Umformung von Gleichung 2 kann man erkennen, dass Streuung bei einem Winkel von 2θ auftritt, wenn $\sin \theta = n \lambda / 2d$ gilt. Der Streuwinkel zeigt also ein umgekehrt proportionales Verhältnis zum Abstand der Kristallgitterebenen: für größere Abstände innerhalb des Kristalls (z.B. Proteinmoleküle) liegen die Reflexe nah beieinander, während für kleinere Abstände (z.B. in Salzkristallen) die Reflexe weit auseinander liegen. Die sich wiederholenden Einheiten eines Kristalls sind die Achsen a , b und c der Einheitszelle, so dass Reflexe an Winkeln auftreten, die den drei Richtungen der Zellachsen entsprechen. Zudem erhält man Reflexe entlang aller Diagonalen des Kristalls, so dass der dreidimensionale Kristall ein dreidimensionales Diffraktionsmuster ergibt. Definiert man einen Streuvektor $\mathbf{S}$ mit der Größe $|\mathbf{S}| = 2 \sin \theta / \lambda$ und einer Richtung senkrecht zur imaginären Reflexionsebene, so zeigt sich, dass alle Streuvektoren $\mathbf{S}$ in einem dreidimensionalen Gitter definiert durch $\mathbf{S} = h \mathbf{a}^* + k \mathbf{b}^* + l \mathbf{c}^*$ liegen, wobei h , k und l ganze Zahlen sind, und $\mathbf{a}^*$, $\mathbf{b}^*$ und $\mathbf{c}^*$ (die reziproken Gittervektoren) umgekehrt proportional zu den Kristallgitter-Parametern $\mathbf{a}$, $\mathbf{b}$ und $\mathbf{c}$ sind. Daher sind die Positionen der Reflexe innerhalb des Diffraktionsmusters einzig von der Natur des Kristalls abhängig; die Phasen $\Phi(hkl)$ und Amplituden $F(hkl)$ sind vom Inhalt der Einheitszelle abhängig. Für einen Kristall kann die Gleichung 1a umgeschrieben werden:

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} F(hkl) \exp \{i\Phi(hkl)\} \{-2\pi i(hx+ky+lz)\} \quad (\text{Gleichung 1c})$$

Dabei sind x , y und z gebrochene Koordinaten innerhalb der Einheitszelle, und $\sum_{hkl}$ ist die Summe aller Reflexe hkl . Es ist üblich, die Atomkoordinaten und Elektronendichten im direkten Raum darzustellen, während die Amplituden, Phasen, Intensitäten und das Diffraktionsmuster im reziproken Raum angegeben werden.

2.6.4 Die Lösung des Phasenproblems

Wie bereits erwähnt, bestehen die Rohdaten eines Röntgendiffraktionsexperiments aus den gemessenen Intensitäten $I(hkl)$ für alle Reflexe h , k und l , aus denen die Amplituden berechnet werden können. Die Phaseninformation, die wichtige Daten zur Lösung der Struktur enthält, geht in den meisten röntgenkristallografischen Experimenten verloren. Daher ist es notwendig, die Phasen durch andere Mittel zu erhalten. Derzeit existieren vier Methoden, um das Phasenproblem zu lösen:

1. Der isomorphe Ersatz, bei dem Schwermetallatome an das Protein im Kristall gebunden werden.
2. Die Messung der Diffraktionsdaten bei verschiedenen Wellenlängen (Multiple anomale Dispersion' (MAD)). Voraussetzung hierfür sind Atome im Protein mit anomaler Streuung (z.B. Zink oder Selen) und genau einstellbare Wellenlängen der Röntgenquelle.
3. Der molekulare Ersatz, der voraussetzt, dass eine ausreichend ähnliche Struktur bereits bekannt ist.
4. Direkte Methoden, die bei kleinen Molekülen (weniger als 1000 Atome) als Standardtechnik angewendet werden. Diese sind nur bei hochaufgelösten Daten anwendbar (atomare Auflösung) und folglich für biologische Makromoleküle weniger geeignet.

Da für die Lösung der Strukturen auf vorhandene Strukturdaten zurückgegriffen werden konnte, wurde die Methode des molekularen Ersatzes verwendet. Daher wird im Folgenden nur auf diese Methode näher eingegangen.

2.6.5 Der Molekulare Ersatz

Für die Phasenbestimmung durch molekularen Ersatz wird eine strukturell (die Sequenzähnlichkeit spielt hier eine weniger bedeutende Rolle) sehr ähnliche Struktur anstelle des gewünschten Proteins als ein erstes Modell verwendet, um initiale Phasen zu erhalten, die dann schrittweise verfeinert werden. Diese Methode basiert auf einer Patterson-Karte, einer Vektorkarte, die interatomare Vektoren zeigt. Sie berechnet sich im Gegensatz zur Elektronendichtekarte nicht mit dem Betrag des Strukturfaktors, sondern durch sein Quadrat, d.h. aus den Intensitäten und ohne Phasenwinkel, so dass diese Funktion direkt aus den Messdaten berechnet werden kann. Die Vektoren zwischen den Atomen des gleichen Moleküls werden als Selbstvektoren bezeichnet, die zwischenmolekularen Vektoren als Kreuzvektoren. Abgesehen von einer unterschiedlichen Orientierung sind die Selbstpattersonkarten eines Moleküls in unterschiedlichen Kristallstrukturen identisch. Bei homologen Molekülen sind sie nicht exakt gleich, aber sehr ähnlich. Dementsprechend können die Selbstvektoren benutzt werden, um die Rotationsbeziehung zwischen der bekannten und der gesuchten Struktur zu bestimmen. Ergänzend dazu kann aus den Kreuzvektoren die Translationsbewegung zwischen den Strukturen ermittelt werden. Daher wird diese Methode auch als Patterson-Suche bezeichnet. Es ist vor allem die Unterteilung der sechsdimensionalen Suche in zwei aufeinander folgende Schritte (Rotations- und Translationsbewegung), die eine Lösung des Phasenproblems mit relativ geringem bzw. begrenztem Rechenaufwand ermöglicht.

Bevor mit einer Patterson-Suche begonnen wird, ist es notwendig, die Anzahl der Moleküle in der asymmetrischen Einheit zu kennen. Dies wird durch die Berechnung des so genannten Matthews-Koeffizienten V_M ermittelt. V_M ist der Quotient aus dem Volumen

der Einheitszelle **V** und dem Produkt aus Molekulargewicht **M**, Anzahl der asymmetrischen Einheiten **N** und Anzahl der Moleküle in einer asymmetrischen Einheit **n**:

$$V_M = V / (N n M) \quad (\text{Gleichung 3})$$

Bei Proteinen liegt V_M gewöhnlich zwischen $1.9 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$ und $2.9 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$. Ein sehr geringer Matthews-Koeffizient von z.B. $1.7 \text{ \AA}^3 \text{Da}^{-1}$ entspricht einem relativ geringen Wassergehalt des Kristalls von rund 22 %. Die Substitution von **n** in Gleichung 3 liefert eine gute Schätzung über die Anzahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit.

Als Maß für die Qualität des durch die Patterson-Suche orientierten und positionierten Modells dient der kristallografische R-Faktor:

$$R_{\text{fac}} = 100 \sum_{\text{hkl}} \{ ||F_{\text{obs}}(\text{hkl})| - \kappa | F_{\text{calc}}(\text{hkl})| \} / \sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}(\text{hkl})| \quad (\text{Gleichung 4})$$

F_{obs} ist hierbei die gemessene Amplitude für einen individuellen Reflex hkl , F_{calc} die vom Modell berechnete Amplitude für denselben Reflex, κ ein Faktor, der die berechneten Amplituden mit den gemessenen Daten skaliert (unabhängig von h , k und l), und $\sum_{\text{hkl}}$ repräsentiert die Summe über allen Reflexen. Der absolute Wert für R_{fac} hängt von der Ähnlichkeit des Modells mit der verfeinerten Struktur ab. Werte zwischen 40 % und 50 % beim ersten Modell weisen auf eine korrekte Lösung hin. Eine fertige, verfeinerte Struktur hat einen R-Faktor von weniger als 20 %.

2.6.6 Von der Dichtekarte zum Modell

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, kann aus den erhaltenen Phasen durch Fourier-Transformation eine Elektronendichtekarte errechnet werden. Es ist nicht immer möglich, die Charakteristika aus der ersten errechneten Dichtekarte herauszulesen. Es bedarf noch vieler Schritte, die Phasen zu verbessern, indem verschiedene Aspekte über die Beschaffenheit von Proteinen (Sekundärstrukturen, Bindungswinkel- und -längen) und Solvens (Hintergrundrauschen) in Kristallen berücksichtigt und in die Verfeinerungszyklen miteinbezogen werden.

2.7 Röntgenkristallografie - Praktische Ausführung

2.7.1 Kristallisieren

Für die Kristallisation von Proteinen benötigt man neben sehr reinem Material (mindestens 99 %) auch relativ hoch konzentrierte Lösungen (10-20 mg/ml). Gegebenenfalls können Stabilisatoren zu den Lösungen hinzu gegeben werden, wie z.B. 10 mM Kalziumchlorid

bei den Trypsin-Varianten. Mit Hilfe von Zentrifugationskonzentratoren (Amicon Ultra 15, MWCO 5 kDa) wurden die Proteinlösungen bis zu 20 mg/ml aufkonzentriert. Für die Kokristallisation mit verschiedenen, niedermolekularen Inhibitoren wurde die jeweilige Proteinvariante mit einem Überschuss an Inhibitor für 30 min auf Eis inkubiert (alle Inhibitoren wurden in Aqua bidest. gelöst, Inhibitor-Endkonzentration: 50 mM bis 50 μ M). Nach Zentrifugation für 5 min bei 20000 g wurde der Überstand abgenommen und für die Kristallisation verwendet (Bauer *et al.*, 1999). Die Kristallisationsansätze erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode mit hängendem Tropfen (McPherson, 1982) in Linbro®-Platten. Von zwölf verschiedenen Puffern, in denen Trypsin bekannterweise kristallisiert, wurden je 500 μ l in das Reservoir der Kristallisationsplatte vorgelegt, dessen Rand zuvor mit Silikonpaste eingefettet wurde. 2 μ l Protein-Inhibitor-Gemisch wurden auf ein rundes Deckgläschen aufgetragen und mit dem gleichen Volumen Kristallisationspuffer versetzt. Sofort wurde das Reservoir mit dem Deckgläschen umgedreht, verschlossen und die Platte bei Raumtemperatur gelagert. Die ersten Kristalle erschienen nach wenigen Stunden bis Tagen und wuchsen innerhalb von zwei Wochen zu ihrer vollen Größe (bis zu 0.7 mm) heran.

Kokristallisationsbedingungen
0.1 M Imidazol
20 und 30 % PEG 8000
0.1, 0.2 und 0.3 M Ammoniumsulfat
pH 7.0 und 8.0

Bei der SSCI-Variante wurden zusätzlich zu den Kokristallisationsansätzen, jeweils in Gegenwart des Inhibitors **(1)** (Benzamidin, **Abbildung 13**) und der Schwermetallverbindungen Quecksilber-II-chlorid bzw. *p*-Chloromercuribenzoat (PCMB, **Abbildung 12**) so genannte *Seeding*-Experimente angesetzt. Dazu wurde der hängende Tropfen, der zuvor mit verdünntem Kristallisationspuffer (2 Teile Kristallisationspuffer, 3 Teile Wasser) im Verhältnis 1:1 gemischt wurde, über einem Reservoir aus 500 μ l verdünntem Kristallisationspuffer angebracht und über Nacht equilibriert. Am nächsten Tag wurde das Reservoir vorsichtig geöffnet, der verdünnte Puffer entnommen und gegen normal konzentrierten Puffer ersetzt. Nach einer weiteren Stunde wurde in jeden Tropfen jeweils ein sehr kleiner Kristall aus nativem, Rindertrypsin eingesetzt und das Reservoir sofort wieder verschlossen.

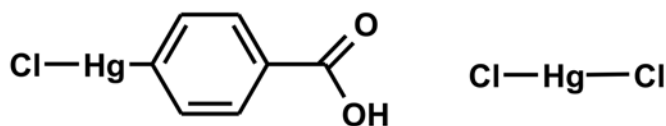


Abbildung 12 *p*-Chloromercuribenzoat und Quecksilber-II-chlorid

Durch Substitutionsreaktionen gehen die quecksilberhaltigen Verbindungen PCMB und HgCl_2 mit den Schwefelatomen von Proteinen kovalente Bindungen ein. Sowohl bei PCMB als auch bei HgCl_2 geht das Chloratom als Abgangsgruppe ab und das Quecksilberatom kann reagieren.

Seeding-Kristallisationsbedingungen

1.9 M Ammoniumsulfat

50 mM MES pH 7.0

Ein Verfahren, bei dem man bereits kristallisierte Proteine mit einem Liganden reagieren lassen kann, nennt sich *soaking*. Durch Einlegen des Proteinkristalls in eine Lösung aus Mutterlauge (Puffer, in dem der Kristall gewachsen ist) und Wirkstoff kann letzterer durch die Kanäle in den Kristall eindringen, an die Bindetasche herandiffundieren und sich dort anlagern.

2.7.2 Datensammlung

Alle Kristalle wurden im flüssigen Stickstoffstrahl bei -180°C vermessen. Als Gefrierschutzmittel dienten 15-20 % Glycerol in der Mutterlauge. In diesen Gefrierschutz-Puffer wurden die Kristalle kurz eingetaucht, bevor sie auf dem Goniometerkopf im Stickstoffstrahl montiert wurden.

Im eigenen Institut wurden die Kristalle mit monochromatischer $\text{Cu-K}\alpha$ -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.54182 \text{ \AA}$) auf einer Image Plate (Rigaku R-AxisVI++, Tokio, Japan) vermessen, die an einem Drehanoden-Röntgengenerator der Firma Rigaku (MicroMax 007, RigakuMSC Tokio, Japan, max. Leistung: 40 kV, 20 mA) installiert war. Die Datensätze wurden als eine Serie von Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkel von $\Delta\varphi = 0.5^\circ$ aufgenommen. Für jede Einzelaufnahme wurde der Kristall 1 oder 2 min lang belichtet.

Mit gleichen Parametern wurden einige Kristalle an Drehanoden-Röntgengenerator in den Arbeitsgruppen von Prof. Gerhard Klebe in Marburg und Prof. Norbert Sträter in Leipzig gemessen.

Weiterhin wurden Datensätze in Synchrotron-Strahlungslaboren am Deutschen Elektronen Synchrotron (DESY) in Hamburg, Messeinrichtung BW6/DORIS der Max-Planck-Gesellschaft/Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, und in der Protein Structure Factory in Berlin, Messeinrichtung BL14.1 der Berliner Elektronenspeicherung-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (BESSY) aufgenommen.

2.7.3 Datenauswertung und Strukturlösung

Die Reflexintensitäten wurden mit den Programmpaketen Crystal Clear™ 1.3.6 (MSC, Texas) und HKL (Otwinowski *et al.*, 1997) integriert, reduziert und skaliert. Als Suchmodelle für die Methode des molekularen Ersatzes wurden Strukturen von Rauh *et al.* (2004) und Stubbs *et al.* (1995) verwendet. Sämtliche Trypsin-Inhibitor-Komplexstrukturen wurden mit Hilfe der Pattersonsuchmethode gelöst. Die Orientierung und Positionierung der Trypsin-Moleküle erfolgte mit dem Programm AMoRe (CCP4, 1994). Zur Lösung der Struktur der *TripleGlu217Phe227*-Variante im Komplex mit Inhibitor **(1)** wurde das Programm Phaser (CCP4, 1994) verwendet, wobei iterativ die Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit erhöht und mit dem Matthews-Koeffizienten verglichen wurde. Die Lösung ergab bei dieser Struktur 16 Moleküle in der asymmetrischen Einheit.

2.7.4 Modellbau und Verfeinerung

Atomare Modelle wurden mit den Programmen O Version 9.0 (Jones *et al.*, 1991) und coot (Emsley *et al.*, 2004) in die Elektronendichten eingepasst. Die Verfeinerungen der Atomkoordinaten erfolgte mit den Programmen CNS (Brünger *et al.*, 1998) und Refmac (CCP4, 1994).

Ziel war die Minimierung des kristallografischen R-Faktors, wobei geometrische Parameter (Engh *et al.*, 1991) berücksichtigt wurden. Im Fall der $P2_12_12_1$ -Kristallform der *TripleGlu217Phe227*-Variante im Komplex mit Inhibitor **(2)** wurde der Rest Asn 115 als isomerisiertes D-Isoaspartat verfeinert. Hierfür wurde eine neue Topologie- und Parameter-Datei erzeugt.

Um ein objektives Kriterium für den Erfolg der Verfeinerungsmethode zu haben, wurden zu Beginn 10 % der Reflexe zufällig ausgewählt und als sogenannter Testset nicht in die Verfeinerungsrechnung miteinbezogen. Der aus ihm berechnete freie R-Faktor warnt durch Vergleich mit dem R-Faktor der verfeinerten Daten dabei vor einer Überanpassung der Daten.

2.7.5 Grafische Darstellungen

Zur grafischen Wiedergabe der Strukturdaten wurde mit dem Programm PyMol (DeLano Scientific LLC, South San Francisco, USA) gearbeitet. Zur Nachbearbeitung von Bildern sowie zur Konvertierung zwischen verschiedenen Formaten fanden die Programme Corel PHOTO-PAINT 11 und CorelDRAW 11 (Corel Corporation Ltd., 2002) Anwendung.

3 Ergebnisse und Diskussion: Steuerung der Proteinflexibilität

3.1 Expression, Kristallisation und Charakterisierung der Trypsin-Varianten

Die verschiedenen Trypsin-Varianten (**Abbildung 6**) konnten wie im Methoden-Teil beschrieben als *inclusion bodies* in den *Escherichia coli*-Stämmen BL21 (DE3) und BL21 (DE3) pLysS exprimiert, rückgefaltet und gereinigt werden. Sie zeigten katalytische Aktivität gegen das chromogene Substrat Pefachrome tPA®, nachdem sie mit Enterokinase aktiviert worden waren. Die Ausbeuten an aktivem Protein lagen zwischen 0.4 mg (*TripleGlu217Phe227*-Variante) und 2.3 mg (*TripleSer217Phe227*-Variante) pro Liter Kultur-Medium (**Tabelle 2**).

Tabelle 2 Ausbeuten der Trypsin-Varianten

Variante	absolute Menge an Zellmasse	g Ausbeute an Zellmasse / l Kultur	absolute Menge <i>inclusion bodies</i>	mg isolierte <i>inclusion bodies</i> /g Zellen	absolute Menge aktives Protein ¹	µg aktives Protein/ mg <i>inclusion bodies</i>	mg aktives Protein / l Kultur
SSCI	12.7 g/6l	2.1 g/l	239.8 mg	18.9 mg/g	3.8 mg	19.4 µg/mg IB	0.6 mg/l
TripleSer217Ile227	ca. 25 g/6l	4.2 g/l	512.9 mg	20.5 mg/g	13.5 mg	96 µg/mg IB	2.3 mg/l
TripleSer217Phe227	ca. 25 g/6l	4.2 g/l	345.7 mg	13.8 mg/g	14 mg	56 µg/mg IB	2.3 mg/l
TripleGlu217Ile227	ca. 25 g/6l	4.2 g/l	446.9 mg	17.9 mg/g	8.3 mg	62 µg/mg IB	1.4 mg/l
TripleGlu217Phe227	ca. 20 g/6l	3.3 g/l	227.9 mg	11.4 mg/g	2.2 mg	9.8 µg/mg IB	0.4 mg/l
enterokinaseähnliches Trypsin	28.1 g/6l	4.7 g/l	520 mg	18.5 mg/g	28 mg	140 µg/mg IB	3.1 mg/l

¹Für die Rückfaltung wurde nicht immer die gesamte gewonnene Menge an *inclusion bodies* eingesetzt

Für die Kokristallisationsexperimente standen neun verschiedene, niedermolekulare Inhibitoren (**Abbildung 13**) zur Verfügung. Mit Ausnahme von **(4)** und **(5)** wurden die verwendeten Inhibitoren bereits in Studien mit Trypsinen, Trypsin-Varianten und Faktor Xa untersucht, wodurch ihre Bindungsmodi bekannt sind (Renatus *et al.*, 1998; Rauh *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 1998; Phillips *et al.*, 1998; Rauh *et al.*, 2003; Stubbs *et al.*, 2002; Pruitt *et al.*, 2000; Arnaiz *et al.*, 1997). Die Inhibitoren **(4)** und **(5)** (Schweinitz *et al.*, 2006) wurden im Zusammenhang mit den Trypsin-Varianten das erste Mal charakterisiert. Die Bezeichnung der Inhibitoren nach IUPAC-Nomenklatur befindet sich im Anhang A.3.

Die Kristallisationen wurden bei Raumtemperatur angesetzt. In den Ansätzen wuchsen schon nach wenigen Stunden bis Tagen Kristalle in unterschiedlichen Kristallformen (**Tabelle 3, Tabelle 5**). Im Falle der SSCI-Variante wurden zusätzlich *Seeding*-Experimente angesetzt, die nach einer Woche Kristalle von brauchbarer Größe lieferten. Es wurden neun verschiedene Kristallformen (A bis I, siehe **Tabelle 3, Tabelle 5, Tabelle 11**) gefunden. Am häufigsten kamen die primitiv-orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12_1$ (Kristallformen B und C) und die primitiv-trigonalen Raumgruppen $P3_121$ (Kristallform A) und $P3_221$ (Kristallformen D, F und I) vor, wie sie auch bei Stubbs *et al.*, 2002, und Rauh *et al.*, 2004, gefunden wurden. Erstmals kristallisierten die Trypsin-Varianten in den Raumgruppen $P6_5$ (primitiv-hexagonal, Kristallform E), $C222$ (zentriert-orthorhombisch; Kristallform H) und $P1$ (primitiv-triklin, Kristallform G).

Die Raumgruppen $P6_5$ und $C222$ sind höher symmetrisch als $P2_12_12_1$, $P3_121$ und $P3_221$. $P1$ ist die einfachste Raumgruppe und zeichnet sich dadurch aus, dass die drei Kristallachsen nicht gleich lang sind ($a \neq b \neq c$), die eingeschlossenen Winkel nicht 90° betragen ($\alpha, \beta, \gamma \neq 90^\circ$) und die asymmetrische Einheit genau der Einheitszelle entspricht.

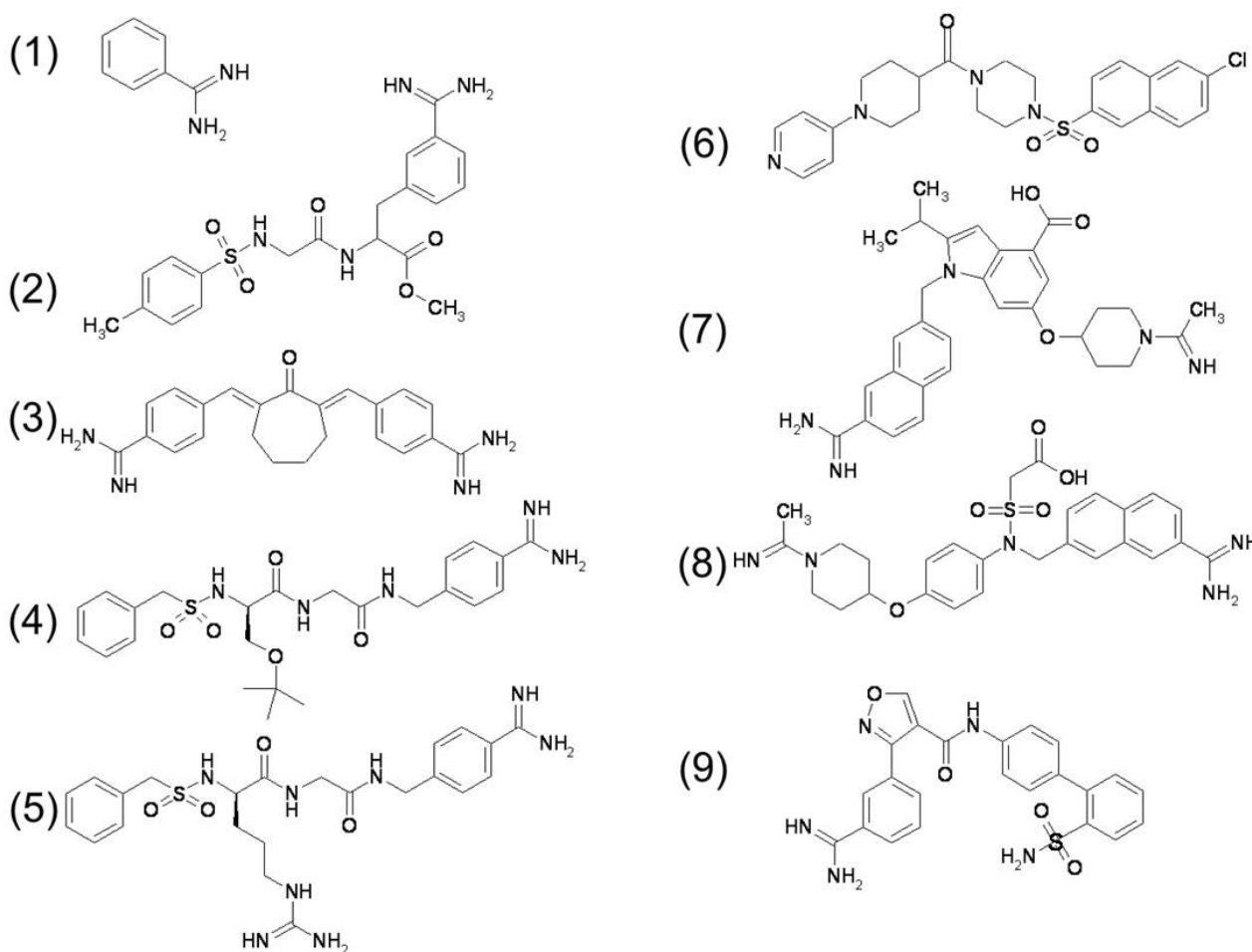


Abbildung 13 Strukturformeln der Inhibitoren

Die verwendeten niedermolekularen Inhibitoren sind mit Ausnahme von **(6)** alle vom Benzamidin abgeleitet, welches die Wechselwirkung in der S1-Bindetasche der untersuchten Trypsin-Varianten vermittelt. Benzamidin **(1)** ist der kleinste und unspezifischste Inhibitor, der verwendet wurde. **(3)** ist von symmetrischer Struktur. Nur in einer Seitenkette unterscheiden sich **(4)** und **(5)** voneinander (*tert*-Butylseryl- bzw. Arginyl-Seitenkette). Bei Inhibitor **(6)** kann, je nach pH-Wert, die Chloronaphthyl- oder die Pyridinyl-Funktion die S1-Bindetasche von Trypsin besetzen (Stubbs *et al.*, 2002).

Die Bestimmung der K_i -Werte wurde mit einem Substrat durchgeführt, für das Trypsin und Faktor Xa etwa in gleichem Maße spezifisch sind. Dazu wurde wie in den vorangegangenen Arbeiten von Reyda und Rauh Pefachrome tPA® ausgewählt. Für die Messungen der K_m - und k_{cat} -Werte wurde mit der Arbeitsgruppe von Jörg Stürzebecher in Jena zusammengearbeitet. Hierfür wurden die Substrate Pefachrome FXa® und Methylumbelliferyl-*p*-guanidinobenzoat verwendet.

Tabelle 3 Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme-Statistik: SSCI-Variante

Struktur ^a	Kristallisationsbedingungen ^b	Li-gand ^c	Kristall-form	Raum-gruppe	Zellkonstanten			gesamte/unabhängige Reflexe	R_{symm}^d (%) gesamt/höchste Auflösung	Auflösung (Å) gesamt/höchste Auflösung
					a α	b β	c γ			
SSCI.B2	30% PEG 8000; 0.1M Imi ^e ; 0.2M AmS ^e ; pH 7.0	2	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	54.2 90	57.5 90	66.4 90	105976/ 19273	4.7, 7.8	50.0-1.82, 1.89-1.82
SSCI.D1	1.9M AmS; 0.05M MES; pH 7.0; 10 μ M PCMB	1	D	P3 ₂ 21	54.6 90	54.6 90	109.0 120	107482/ 23956	8.0, 22.4	50.0-1.69, 1.75-1.69

^a Die Strukturen werden wie folgt bezeichnet: {Variante}{Kristallform} {Inhibitor}.

^b Alle Kristalle wurden bei Raumtemperatur erhalten.

^c Siehe Abbildung 13 Strukturformeln der Inhibitoren

^d $R_{\text{sym}} = \sum (|I - \langle I \rangle|) / \sum (I)$

^e Imidazol, Ammoniumsulfat

Tabelle 4 Verfeinerungsstatistik: SSCI-Variante

Struktur	Anzahl der nicht-Wasserstoffatome/asymmetrische Einheit				Mittlere quadratische Abweichung		$R_{\text{work}}(\%)$ gesamt/höchste Auflösung	$R_{\text{free}}(\%)$ gesamt/höchste Auflösung
	Protein	Ionen	Solvens	Inhibitor	Bindung(Å)	Winkel(°)		
SSCI.B2	1623	1 Ca ²⁺ , 2 SO ₄ ²⁻	153	30	0.0049	1.344	19.4	22.1
SSCI.D1	1623	1 Ca ²⁺ , 2 SO ₄ ²⁻	126	9	0.0526	1.380	22.2	27.0

Tabelle 5 Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme-Statistik: TripleXxx217Xxx227-Varianten

Struktur ^a	Kristallisationsbedingungen ^b	Li-gand ^c	Kristall-form	Raum-gruppe	Zellkonstanten			gesamte/unabhängige Reflexe	R_{symm}^d (%) gesamt/höchste Auflösung	Auflösung (Å) gesamt/höchste Auflösung
					a α	b β	c γ			
TripleSer217Ile227.A1	20% PEG 8000; 0.1 M Imi ^e ; 0.3 M AmS ^e ; pH 8.0	1	A	P3 ₂ 21	54.7 90	54.8 90	107.9 120	140865/ 62088	4.7, 44.0	99.0-1.18, 1.20-1.18
TripleSer217Ile227.A2	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 7.0	2	A	P3 ₂ 21	54.6 90	54.6 90	109.0 120	344918/ 29785	4.5, 12.9	50.0-1.52, 1.57-1.52
TripleSer217Ile227.A3	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 8.0	3	A	P3 ₂ 21	55.1 90	55.1 90	108.9 120	210585/ 24576	6.9, 26.9	28.9-1.63, 1.69-1.63
TripleSer217Ile227.A4	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 8.0	4	A	P3 ₂ 21	54.5 90	54.5 90	111.7 120	350479/ 30348	3.0, 6.5	50.0-1.52, 1.57-1.52

Struktur ^a	Kristallisations- bedingungen ^b	Li- gand ^c	Krist all- form	Raum- gruppe	Zellkonstanten			gesamte/ unab- hängige Reflexe	R _{symm} ^d (%) gesamt/ höchste Auflösung	Auflösung (Å) gesamt/ höchste Auflösung
					a α	b β	c γ			
<i>TripleSer217Ile227.A5</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.3 M AmS; pH 7.0	5	A	P3 ₁ 21	54. 90	54.7 90	112.0 120	189250/ 32308	6.8, 31.9	21.8-1.45, 1.50-1.45
<i>TripleSer217Ile227.A9</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 7.0	9	A	P3 ₁ 21	54.5 90	54.5 90	107.4 120	263667/ 23799	8.3, 39.4	28.5-1.63, 1.69-1.63
<i>TripleSer217Phe227.C1</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 7.0	1	C	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	57.9 90	64.1 90	70.4 90	417418/ 48215	6.7, 39.0	50.0-1.62, 1.71-1.62
<i>TripleSer217Phe227.B2</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 7.0	2	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	54.3 90	57.2 90	66.9 90	112316/ 19879	8.3, 41.4	24.5-1.80, 1.86-1.80
<i>TripleSer217Phe227.F5</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 8.0	5	F	P3 ₂ 21	55.1 90	55.1 90	154.9 120	156002/ 28059	8.6, 28.2	35.0-1.69, 1.75-1.69
<i>TripleSer217Phe227.F7</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 8.0	7	F	P3 ₂ 21	54.6 90	54.6 90	154.9 120	168812/ 40804	5.0, 19.5	47.3-1.54, 1.59-1.54
<i>TripleSer217Phe227.H8</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 8.0	8	H	C222 ₁	74.5 90	77.8 90	171.8 90	532407/ 29135	8.0, 14.7	30.0-2.10, 2.23-2.10
<i>TripleSer217Phe227.D9</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 8.0	9	D	P3 ₂ 21	54.7 90	54.7 90	113.0 120	107032/ 18782	9.5, 36.5	27.6-1.80, 1.86-1.80
<i>TripleSer217Phe227.E9</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 7.0	9	E	P6 ₅	84.5 90	84.5 90	51.4 120	80694/ 10755	16.7, 38.8	29.8-2.40, 2.49-2.40
<i>TripleGlu217Ile227.A1</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 8.0	1	A	P3 ₁ 21	54.6 90	54.6 90	106.5 120	167485/ 23624	10.7, 42.9	19.7-1.63, 1.69-1.63
<i>TripleGlu217Ile227.A2</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 7.0	2	A	P3 ₁ 21	54.4 90	54.4 90	109.1 120	131550/ 24403	5.8, 24.6	28.8-1.60, 1.66-1.60
<i>TripleGlu217Ile227.I5</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 8.0	5	I	P3 ₂ 21	54.0 90	54.0 90	137.1 120	172054/ 26369	10.2, 38.5	50.0-1.70, 1.75-1.70
<i>TripleGlu217Ile227.E9</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 7.0	9	E	P6 ₅	81.7 90	81.7 90	63.6 120	148593/ 16366	16.8, 39.8	19.6-2.00, 2.07-2.07
<i>TripleGlu217Phe227.G1</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.3 M AmS; pH 7.0	1	G	P1	88.7 89.9	98.6 88.9	120.8 104.0	370469/ 78880	11.3 , 39.2	50.0-2.90, 3.04-3.04
<i>TripleGlu217Phe227.B2</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 8.0	2	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	53.6 90	57.3 90	65.7 90	434909/ 38823	4.4, 21.7	50.0-1.42, 1.47-1.42
<i>TripleGlu217Phe227las.B2^f</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.1 M AmS; pH 8.0	2	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	54.5 90	57.5 90	67.0 90	328860/ 23549	9.7, 33.4	33.5-1.90, 1.97-1.90
<i>TripleGlu217Phe227.I5</i>	30% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 8.0	5	I	P3 ₂ 21	54.3 90	54.3 90	136.9 120	146771/ 22494	9.5, 36.1	34.2-1.80, 1.86-1.80
<i>TripleGlu217Phe227.E9</i>	20% PEG 8000; 0.1 M Imi; 0.2 M AmS; pH 7.0	9	E	P6 ₅	81.8 90	81.8 90	63.9 120	270243/ 30439	11.8, 39.5	35.4-1.63, 1.69-1.63

^a Die Strukturen werden wie folgt bezeichnet: {Variante} {Kristallform} {Inhibitor}.

^b Alle Kristalle wurden bei Raumtemperatur erhalten.

^c Siehe Abbildung 13 Strukturformeln der Inhibitoren

^d $R_{\text{sym}} = \sum (|I - \langle I \rangle|) / \sum (I)$

^e Imidazol, Ammoniumsulfat

^f las = Isoaspartat. In dieser Struktur ist ein Isoaspartat an Position 115.

Tabelle 6 Verfeinerungsstatistik: TripleXxx217Xxx227-Varianten

Struktur	Anzahl der nicht-Wasserstoffatome/ asymmetrische Einheit				Mittlere quadratische Abweichung		R _{work} (%) gesamt/ höchste Auflösung	R _{free} (%) gesamt/ höchste Auflösung
	Protein	Ionen	Solvens	Inhibitor	Bindung(Å)	Winkel(°)		
TripleSer217Ile227.A1	1633	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	219	9	0.0100	1.569	20.7	22.7
TripleSer217Ile227.A2	1633	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	227	30	0.0090	1.290	15.9	18.0
TripleSer217Ile227.A3	1633	1 Ca ²⁺	208	28	0.0110	1.410	17.8	21.8
TripleSer217Ile227.A4	1633	1 Ca ²⁺	246	35	0.0130	1.500	16.6	19.5
TripleSer217Ile227.A5	1633	1 Ca ²⁺	153	35	0.0095	1.579	22.9	25.7
TripleSer217Ile227.A9	1633	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	119	33	0.0105	1.592	21.6	26.1
TripleSer217Phe227.C1	1638	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	170	9	0.0112	1.706	20.6	22.2
TripleSer217Phe227.B2	1637	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	105	30	0.0092	1.567	21.6	23.7
TripleSer217Phe227.F5	1637	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	123	35	0.0096	1.555	22.8	24.7
TripleSer217Phe227.F7	1638	1 Ca ²⁺	205	39	0.0090	2.250	21.3	23.9
TripleSer217Phe227.H8	3276	2 Ca ²⁺	237	74	0.0150	1.631	17.1	21.2
TripleSer217Phe227.D9	1637	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	86	33	0.0102	1.580	24.1	27.3
TripleSer217Phe227.E9	1637	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	87	33	0.0099	1.615	18.9	25.8
TripleGlu217Ile227.A1	1633	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	197	9	0.0088	1.546	19.9	24.4
TripleGlu217Ile227.A2	1633	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	184	30	0.0099	1.615	19.5	22.8
TripleGlu217Ile227.I5	1633	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	102	35	0.0092	1.62	22.4	25.1
TripleGlu217Ile227.E9	1633	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	126	33	0.0080	1.501	19.6	23.9
TripleGlu217Phe227.G1	26240	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	n.d.	144	0.008	1.400	25.0	27.5
TripleGlu217Phe227.B2	1640	1 Ca ²⁺	175	30	0.0110	1.450	18.6	20.4
TripleGlu217Phe227.Ias.B2	1640	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	122	30	0.0103	1.563	19.5	23.2
TripleGlu217Phe227.I5	1640	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	148	35	0.0095	1.609	21.1	24.1
TripleGlu217Phe227.E9	1640	1 Ca ²⁺ ; 1 SO ₄ ²⁻	212	33	0.0100	1.638	18.8	20.4

3.2 Teil A: Chemische Steuerung der Proteinflexibilität - Einbau eines molekularen Schalters

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, sollten die in dem Modellsystem des Rindertrypsins mit Faktor Xa-Bindetasche (Rauh *et al.*, 2002 & 2004) aufgetretenen verschiedenen Konformationen der ,175er'-Schleife auf chemischem Wege so moduliert werden, dass die so genannte ,down'-Konformation nicht mehr möglich ist (**Abbildung 14**). Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde bei der so genannten SSFI-Variante an Position 174 Phe gegen Cys ausgetauscht. Die erhaltene SSCI-Variante enthielt nun neben den 12 Wildtyp-Cysteinen, die durch korrekte Faltung über Disulfidbrücken miteinander verknüpft

sind, ein weiteres Cystein, welches frei an der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist. Dieses Cystein sollte als molekularer Schalter für eine chemische Steuerung der Proteinflexibilität dienen. Um die leicht oxidierbare Thiol-Gruppe des Cysteins vor Oxidation zu schützen, wurde allen Lösungen, die nach der Rückfaltung mit der SSCI-Variante in Kontakt kamen, 1 mM Dithiothreitol (DTT) zugesetzt. Die hohe Reaktionsbereitschaft der Thiol-Gruppe von Cysteinen wurde dazu ausgenutzt, um nach erfolgter Aufreinigung einen Schwermetallrest kovalent und somit dauerhaft an das Schwefelatom des Cys zu binden. Es wurde eine anorganische und eine organische Quecksilberverbindung ausgewählt. Zum Einsatz kamen Quecksilber-II-chlorid und *p*-Chloromercuribenzoat (PCMB) (**Abbildung 12**).

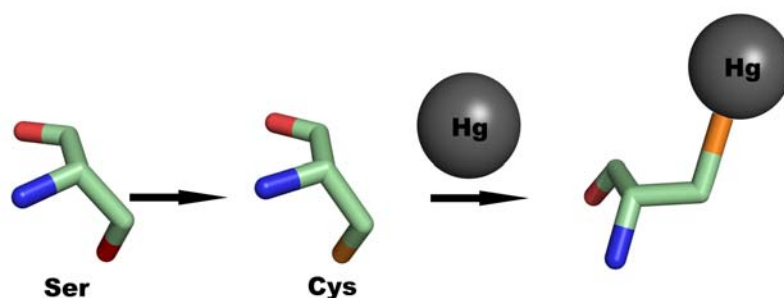


Abbildung 14: Einbau eines molekularen Schalters

Nach Mutation des Ser 174 in der SSFI-Variante zu Cys 174 wurde die gereinigte, aktive Proteinase mit einer Quecksilberverbindung versetzt. Die Reaktion soll eine große und somit unbeweglichere Seitenkette erzeugen.

Die Ausbeute der biotechnischen Herstellung der SSCI-Variante fiel im Vergleich zu den anderen Trypsin-Varianten relativ gering aus. Aus einem Volumen von 6 l Schüttelkultur konnten 1.5 mg bzw. 3.8 mg (letzte unter Zugabe von 1 mM DTT) aktives Protein gewonnen werden. Ursache für die relativ geringen Ausbeuten könnte der zusätzliche Cystein-Rest sein, der unerwünschte Oxidationsprodukte oder vermehrt falsch gefaltetes Protein erzeugt. Das reduzierende Agens DTT half, die Ausbeute der SSCI-Variante zu steigern. In den Kokristallisationsexperimenten mit Quecksilber-II-chlorid wuchsen keine Kristalle heran. Aus den Ansätzen der SSCI-Variante mit dem Inhibitor (**2**) konnte ein kleiner Kristall (0.1 mm) mit Synchrotronstrahlung bis zu einer Auflösung von 1.7 Å vermessen werden. Die Elektronendichte zeigt klar definiert den Inhibitor in der Bindetasche der Proteinase (**Abbildung 15a**). Die Amidfunktion des Inhibitors (**2**) befindet sich in der S1-Bindetasche und übt eine ionische Wechselwirkung mit der Seitenkette des Asp 189 aus, welches am Boden der S1-Tasche liegt. Diese Interaktion ist ein Charakteristikum für viele benzamidinartigen Inhibitoren. Die S3/S4-Bindetasche ist von der Tosyl-Gruppe besetzt und überragt die aromatische Seitenkette von Trp 215. Dagegen ist im Bereich der ,175er'-Schleife für sechs Aminosäurereste von Lys 169 bis Ile 176 keine Elektronendichte zu erkennen, d.h. die Schleife befindet sich weder in einer eindeutigen ,up'- noch in einer ,down'-Konformation, sondern nimmt offenbar verschiedene Konformationen ein, da sie trotz des Verbundes in einem Kristall relativ flexibel ist

(**Abbildung 15b**). Betrachtet man bei dieser Kristallform (Kristallform B, $P2_12_12_1$) die einzelnen Proteinmoleküle innerhalb des Kristallverbundes kann man im Bereich der Bindetasche Kristallkontakte zu symmetrieverwandten Molekülen erkennen. Der Inhibitor, der in der Bindetasche lokalisiert ist, ist durch die Symmetriekontakte sozusagen eingeschlossen. Ebenso sind diese im Bereich der flexiblen Schleife sehr nah, dass eine ‚up‘-Konformation der Schleife innerhalb dieser Kristallpackung nicht möglich wäre (nicht gezeigt). Dieses Phänomen konnte auch bei *Rauh et al.*, 2004, bei Varianten derselben Kristallform beobachtet werden.

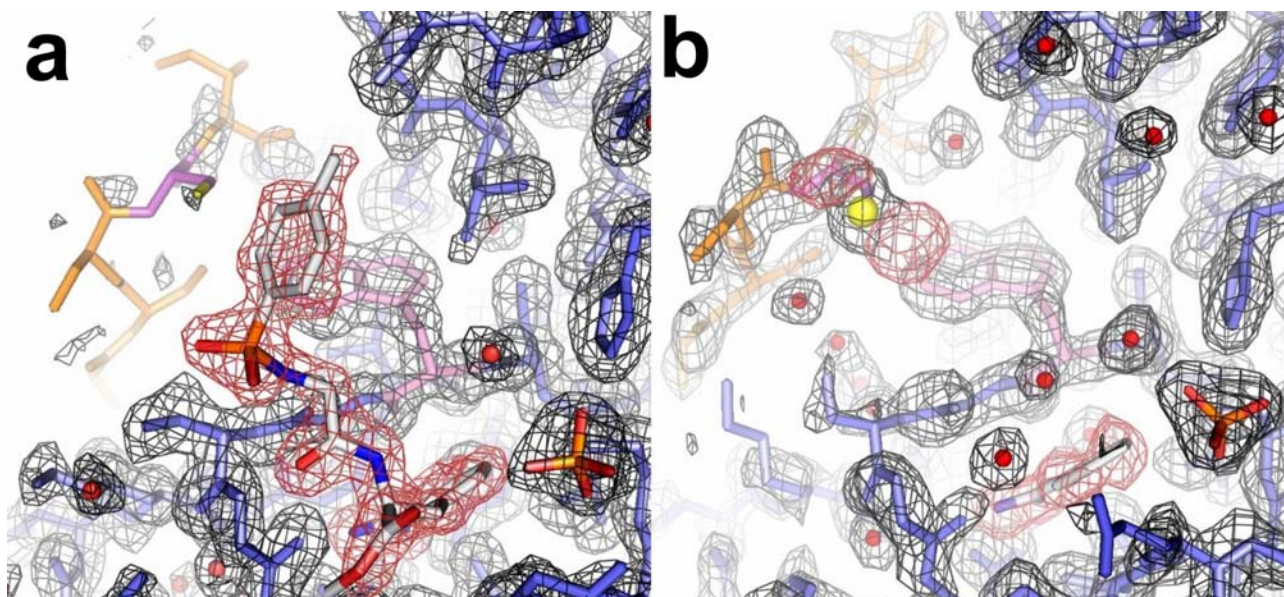


Abbildung 15 SSCI-Variante ohne und mit PCMB

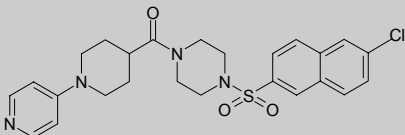
a Ausschnitt aus der Kristallstruktur der SSCI-Variante: Dargestellt ist die Elektronendichte (blaues Netz) und das angepasste Modell (blaue sticks) im Bereich der *active site*. Inhibitor (**2**) ist als rotes Elektronendichtenetz gezeigt. Im Bereich der ,175er'-Schleife ist keine Elektronendichte zu sehen, da dieser Bereich durch die Flexibilität nicht klar definiert ist. In **b** ist der gleiche Ausschnitt der Kristallstruktur wie in **a** zu sehen, jedoch nach Umsetzung mit PCMB und im Komplex mit Inhibitor (**1**) (rotes Dichtenetz). Der Bereich der ,175er'-Schleife ist durch die vorhandene Elektronendichte klar definiert und weist die ‚up‘-Konformation auf. Auch Teile des kovalent gebundenen PCMB sind zu sehen (Das Quecksilberatom ist als gelbe Kugel dargestellt.).

Anders verhält sich die ,175er'-Schleife, wenn das Protein vor dem Ansetzen der Kristallisation mit der Quecksilberverbindung *p*-Chloromercuribenzoat (10 μ M) für einige Minuten (ca. 10-15 min) inkubiert wurde. Mit Hilfe der *Seeding*-Kristallisationstechnik waren ebenfalls kleine Kristalle gewachsen (Kristallform D, $P3_221$), die mit Synchrotronstrahlung vermessen wurden und bis zu einer Auflösung von 1.8 Å streuten. Die Auswertung und Verfeinerung der Daten zeigt nun eine definierte Elektronendichte im gesamten Bereich der flexiblen Schleife. Um den Rest Cys 174 kann man im Bereich der Thiol-Gruppe die zusätzliche Dichte eines relativ großen Atoms erkennen, die man dem Quecksilberatom des PCMB zuordnen kann, da dieses erkennbar kovalent an den Schwefel gebunden ist. Reste von zusätzlicher Dichte deuten weiterhin die Fortsetzung der Quecksilber-Verbindung an. Vollständig ist sie allerdings nicht zu sehen. Die Röntgenmessdaten zeigen, dass der Bereich der flexiblen Schleife zu einem Solvenskanal

zeigt und keine Kristallkontakte aufweist. Es ist anzunehmen, dass der Benzoat-Rest des PCMB in diesen hineinragt, wo er ausreichend Platz für Molekülrotationen hat. Zudem ist der Inhibitor nicht durch enge Kristallkontakte eingeschlossen.

Für die SSCI-Variante wurde in einer Messreihe (Stürzebecher *et al.*, 1997) in Gegenwart des Inhibitors **(6)** eine Inhibitionskonstante von 250 μM bestimmt, die um den Faktor 20 niedriger als für Rindertrypsin (12 μM) und um 5 Potenzen höher als für Faktor Xa (0.02 μM) liegt. In Arbeiten von Rauh *et al.*, 2004, wurden für Varianten, die anstelle des Cys in Position 174 ein Trp, Phe, Tyr, Ala oder Arg enthielten, K_i -Werte mit Inhibitor **(6)** erhalten, die mit dem für die SSCI-Variante ermittelten gut korrespondieren (**Tabelle 7**). Die Varianten mit hydrophoben Resten in Position 174 zeigen gleiche K_i -Werte (SSWI, SSFI, SSYI). Sind die Reste klein (SSAI) oder gar partiell geladen (SSCI, SSRI), verschlechtert sich die Hemmung.

Tabelle 7 K_i -Werte-Vergleich: SSCI-Variante und SSXI-Varianten

Proteinase	
	K_i -Wert [μM]
bovines Trypsin	12
SSWI ¹	12
SSFI ¹	15
SSYI ¹	19
SSAI ¹	97
SSCI	250
SSRI ¹	>1000
Faktor Xa ¹	0.02

¹ Werte aus Rauh *et al.*, 2005

Die Daten zeigen, dass eine chemische ‚Fixierung‘ durch die kovalente Modifikation möglich ist und dadurch die erwünschte, Faktor Xa-ähnliche ‚up‘-Konformation gesteuert werden kann.

In Gegenwart von PCMB konnten keine verwertbaren K_i -Werte für die SSCI-Variante gemessen werden. Grund hierfür waren Löslichkeitsprobleme (trübe Lösung) des PCMB unter den gegebenen Pufferbedingungen, die eine einwandfreie Absorptionsmessung unmöglich machten. Zudem waren die Ausbeuten an der SSCI-Variante jeweils sehr gering, so dass für die Bestimmung von K_i -Werten mit anderen Inhibitoren nicht ausreichend Protein zur Verfügung stand.

3.3 Teil B: Sterische Hinderung der Proteinflexibilität - Modifizierung des Inneren eines Enzyms

Ein weiterer Ansatzpunkt, um die Proteinflexibilität zu steuern, war die Einführung von größeren Aminosäureresten in der Umgebung der flexiblen Schleife. Der Austausch des Val 227, welches unterhalb des Phe 174 und Trp 215 lokalisiert ist, gegen Ile oder Phe sollte durch sterische Hinderung des Phe 174 die flexible Schleife in die Faktor Xa-ähnliche ‚up‘-Konformation dirigieren (**Abbildung 8**). In vorangegangenen Arbeiten von Rauh *et al.*, 2002, und Rauh *et al.*, 2004, hatte sich gezeigt, dass die Einführung der Bindetasche des Faktor Xa in Rindertrypsin die so genannte *TripleSer217Val227*-Variante erzeugte, die ausschließlich die ‚down‘-Konformation zeigte. Die zusätzliche Mutation Ser217Glu in der *Triple*-Variante führte zur *TripleGlu217Val227*-Variante, die sowohl in der ‚down‘- als auch in der ‚up‘-Konformation auftrat.

Daher sollten die *TripleSer217Val227*-Variante und die *TripleGlu217Val227*-Variante weitere Mutationen an der Position 227 erhalten, um die Flexibilität der ‚175er‘-Schleife zu kontrollieren. Demzufolge wurden die folgenden Varianten hergestellt:

Auf Basis der *TripleSer217Val227*-Variante:

TripleSer217Ile227-Variante und *TripleSer217Phe227*-Variante

Auf Basis der *TripleGlu217Val227*-Variante:

TripleGlu217Ile227-Variante 7 und *TripleGlu217Phe227*-Variante

Die Val227Ile-Mutation ist dem Faktor Xa angenähert, welcher in Position 227 ein Ile besitzt. Eine Verstärkung des sterischen Effekts sollte durch den Val227Phe-Austausch bewirkt werden, in Anlehnung an die verwandte Proteinase Thrombin der Blutgerinnungskaskade.

3.3.1 *TripleSer217Ile227*-Variante

Entgegen der Hypothese, dass die Einführung einer zusätzlichen Methyl-Gruppe (Val gegen Ile) die ‚up‘-Konformation forciert, zeigt die *TripleSer217Ile227*-Variante in allen bestimmten Strukturen die ‚down‘-Konformation. Andererseits zeigen alle untersuchten Inhibitoren bei der *TripleSer217Ile227*-Variante eine deutlich verringerte Affinität im Vergleich zur Ausgangs-Variante *TripleSer217Val227*. Die K_i -Werte (**Tabelle 9**) verringern sich im Verhältnis zur Ausgangs-Variante *TripleSer217Val227* um die Faktoren 2 bis 6, bei Inhibitor **(3)** reduzierte sich der K_i -Wert nur geringfügig.

Tabelle 8 Enzymkinetische Parameter I

Variante	tPA-Substrat			fXa-Substrat		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$)
<i>Rindertrypsin</i>	11.9	36.2	3.04	28.7	39.4	1.37
<i>TripleSer217Val227</i>	104	n. b.	n. b.	118	n. b.	n. b.
<i>TripleSer217Ile227</i>	988	247	0.25	171	23.7	0.14
<i>TripleSer217Phe227</i>	1610	227	0.14	81.1	7	0.09
<i>TripleGlu217Val227</i>	61.6	176	2.86	60.6	103	1.70
<i>TripleGlu217Ile227</i>	241	250	1.04	117	90.1	0.77
<i>TripleGlu217Phe227</i>	88.1	165	1.87	36.5	47.9	4.62
<i>Faktor Xa</i>	71.3	147	2.06	88.5	143	1.62

n. b. = nicht bestimmbar

Tabelle 9 Enzymkinetische Parameter II

Variante	K_i -Werte (μM) tPA-Substrat								
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)
<i>Rindertrypsin</i>	39	4.4	0.4	0.01	0.013	13	0.014	0.01	0.04
<i>TripleSer217Val227</i>	69	22	1.25	0.05	0.054	2	0.102	0.039	0.6
<i>TripleSer217Ile227</i>	227	110	1.8	0.3	0.36	3.6	0.447	0.14	1.95
<i>TripleSer217Phe227</i>	695	290	2.5	0.2	1.03	0.9	0.148	0.156	1.22
<i>TripleGlu217Val227</i>	51	32	0.005	0.007	0.022	0.65	0.008	0.006	0.04
<i>TripleGlu217Ile227</i>	96	23	1.2	0.02	0.064	0.5	0.023	0.008	0.07
<i>TripleGlu217Phe227</i>	186	24	0.08	0.003	0.037	0.024	0.004	0.003	0.02
<i>Faktor Xa</i>	160	0.84	0.025	0.006	0.007	0.02	0.002	0.0009	0.0003

Anhand der Strukturen der *TripleSer217Ile227*-Variante werden im Folgenden die Bindungsmodi der Inhibitoren in der Substratbindetasche des Trypsins beschrieben.

Inhibitor **(1)**, das Benzamidin, ist der kleinste der getesteten Inhibitoren. Er besetzt nur die primäre Spezifitätsbindetasche S1 (**Abbildung 16a**) und bildet eine Salzbrücke mit der Seitenkette des Asp189 (s.o.). Die S3/S4-Bindetasche bleibt frei.

Auch bei Inhibitor **(2)** ist die Amidinfunktion in der S1-Bindetasche lokalisiert, während der Methylester-Rest zum Solvens zeigt (**Abbildung 16b**). Die Tosyl-Gruppe wurde bereits in vorangegangenen Arbeiten in zwei unterschiedlichen Bindungsmodi beobachtet und übt mehr oder weniger starke Wechselwirkungen mit den aromatischen Ring-Systemen der S3/S4-Bindetasche aus, die daher auch als *hydrophobic box* (hydrophobe Tasche)

bezeichnet wird (Renatus *et al.*, 1998; Rauh *et al.*, 2004). Im Komplex mit der *TripleSer217Ile227*-Variante ist die Tosyl-Gruppe des Inhibitors (**2**) so angeordnet, dass der aromatische Ring nahezu koplanar zu der aromatischen Seitenkette des Trp 215 liegt (**Abbildung 16b**). Die durch das vergrabene Phe 174 unvollständige *hydrophobic box* schafft mehr Platz und erlaubt somit diese Orientierung der Tosyl-Gruppe. Das Oⁿ-Atom der Seitenkette des Tyr 99 übt eine schwache Wasserstoffbrückenbindung (3.4 Å) mit einem Sauerstoffatom der Sulfonamid-Funktion aus.

Der symmetrische Inhibitor (**3**) besitzt zwei Amidinobenzyl-Reste. Der proximale Rest füllt die primäre Spezifitätsbindetasche aus, der distale Rest die S3/S4-Bindetasche. Bezüglich des Cycloheptanon-Ringsystems wurden verschiedene Bindungsmodi, d.h. EZ-, EE- und ZZ-Isomere beschrieben (Shaw *et al.*, 1998; Phillips *et al.*, 1998; Rauh *et al.*, 2003). In der dargestellten Struktur kommt der Inhibitor (**3**) in der (ZZ)-Konfiguration (**Abbildung 16c**) vor. Der Cycloheptanon-Ring nimmt die Sesselkonformation ein, wodurch die Amidinobenzyl-Reste in der S1- bzw. S3/S4-Tasche lokalisiert sind. Der Cycloheptanon-Ring ist dem Tyr 99 zugeneigt, so dass sich eine schwache Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-O-Atom und dem Stickstoffatom des Gly 216 ausbildet (3.2 Å).

Die Inhibitoren (**4**) und (**5**) werden hier erstmals in einer Kristallstruktur beschrieben. Beide binden in ähnlicher Weise (**Abbildung 16d**, **Abbildung 16e**). Erwartungsgemäß besetzt ihr Amidinobenzyl-Rest die S1-Bindetasche. Inhibitor (**5**) ist durch seine Arginyl-Seitenkette in P3-Position von Interesse: die relativ starke, positive Partialladung der Guanidiono-Gruppe ist nicht dem Lösungsmittel zugeneigt, sondern platziert sich in der hydrophoben S3/S4-Bindetasche. Diese Verhaltensweise konnte bei anderen, ähnlichen Faktor Xa-Inhibitoren gezeigt werden, die basische Seitenketten in Position P3 besitzen (Schweinitz *et al.*, 2006). Der Kontakt in der S3/S4-Bindetasche könnte auf einer Polarisations-Wechselwirkung beruhen, wie es für quartäre Amine bekannt ist. Diese binden gut in Kavitäten, die von aromatischen Seitenketten eines Proteins gebildet werden (Böhm *et al.*, 1996). Demzufolge sind jeweils die N-terminalen Benzyl-Reste der Inhibitoren (**4**) und (**5**) dem Lösungsmittel bzw. einer weiteren Bindetasche zugewandt (s.u.). Inhibitoren dieser Art, d.h. mit basischen Seitenketten in P3, zeichnen sich durch eine hohe antikoagulative Aktivität für Faktor Xa aus (Stubbs, 1996; Schweinitz *et al.*, 2006), besitzen jedoch eine schlechte orale Bioverfügbarkeit.

Bei Inhibitor (**4**) bindet der *tert*-Butylseryl-Rest in der hydrophoben Tasche. Beide Inhibitoren (**4**) und (**5**) bilden eine Reihe von Wasserstoffbrücken mit den Aminosäureresten Ser 214, Gly 216 und Ser 219 der Hauptkette und der Seitenkette von Tyr 99. Durch den *tert*-Butylseryl-Rest bzw. Arginyl-Rest der Inhibitoren (**4**) und (**5**) ist die S3/S4-Bindetasche der *TripleSer217Ile227*-Variante ideal ausgefüllt. Die Benzyl-Reste der Inhibitoren (**4**) und (**5**) weisen zwei verschiedene Konformationen auf.

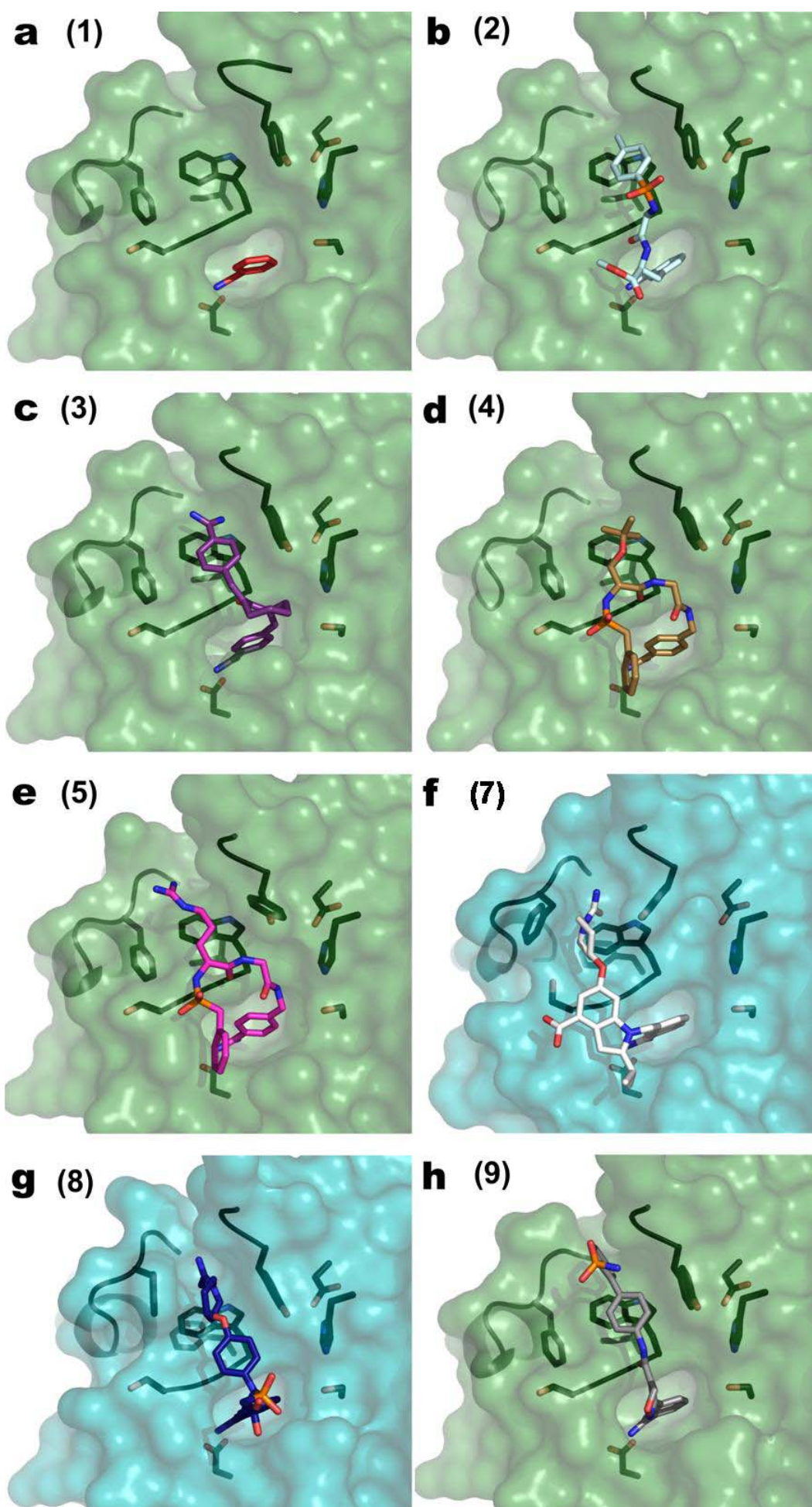


Abbildung 16 Bindungsmodi der Inhibitoren I

Aufgeführt sind die verschiedenen Bindungsmodi der Inhibitoren (1), (2), (3), (4), (5), (7), (8) und (9). In jedem Bild ist die Oberfläche der *active site* dargestellt. Zusätzlich sind die Sekundärstruktur der S3/S4-Bindetasche in Bänderdarstellung und die Aminosäureseitenketten der katalytischen Triade, der Reste 99, 174, 215 (S3/S4), 189 (S1), 217 und 227 in *sticks*-Darstellung gezeigt. Bei grüner Oberfläche handelt es sich um die *TripleSer217Val227*-Variante, bei türkisfarbener Oberfläche um die *TripleSer217Phe227*-Variante.

In einer Orientierung (**Abbildung 16d**, **Abbildung 16e**, Kristallform A) ragt der aromatische Rest in eine hydrophobe Nebentasche, die durch die Seitenkette von Gln 192, der Disulfidbrücke zwischen Cys 191 und Cys 220 und durch Gly 192 gebildet wird. Diese Nebentasche wurde bereits bei Urokinaseinhibitoren beschrieben und als S1_β-Bindetasche bezeichnet (Nienhaber *et al.*, 2000). Die Sulfonyl-Gruppe beider Inhibitoren steht in engem Kontakt mit einem symmetrieverwandten Molekül, sowie der Arginyl-Rest, der Wasserstoffbrücken mit den benachbarten Resten Ser 127* O^y (3.0 Å), Ser 127* O (3.7 Å) und Cys 128 (2.7 Å) bildet. In einer anderen Kristallform (Kristallform I, *TripleGlu217Ile227*-Variante im Komplex mit (5)) kann man eine andere Orientierung des Benzyl-Restes beobachten (**Abbildung 18**), in der dieser um 107° nach außen gedreht und dem Lösungsmittel zugewandt ist. In beiden Orientierungen bildet das Sulfonyl-Sauerstoffatom des Benzylsulfonyl-Restes Wasserstoffbrücken zum Amid-Stickstoffatom von Gly 219 (3.0 Å) und das Sulfonamid-Stickstoffatom zum Carbonyl-Sauerstoffatom von Gly 216 (2.6 Å). Die sehr gut angepassten Wechselwirkungen der Seitenketten der Inhibitoren (4) und (5) tragen zur hohen Affinität zum Protein bei (0.3 μM bzw. 0.36 μM, **Tabelle 9**).

Inhibitor (6) ist im Vergleich zu allen anderen getesteten Inhibitoren weniger basisch. Anstelle einer Benzamidin-Funktion trägt er eine Pyridinyl- und eine Chloronaphthyl-Gruppe, die bei Rindertrypsin in Abhängigkeit des pH-Wertes entweder die S1- oder die S3/S4-Bindetaschen besetzen können (Stubbs *et al.*, 2002). Mit diesem Inhibitor konnten im Rahmen dieser Arbeit mit keiner der hergestellten Trypsin-Varianten Kristalle erhalten werden. Inhibitor (6) ist ein starker Inhibitor für Faktor Xa (20 nM) und weniger spezifisch für Rindertrypsin (13 μM). Dies spiegelt sich in den Hemmkonstanten für die Varianten *TripleSer217Ile227* und *TripleGlu217Phe227* wieder (**Tabelle 9**): erstere verhält sich dem Trypsin ähnlich (3.6 μM), während letztere dem Faktor Xa näher ist (24 nM).

Einen etwas anderen Aufbau zeigt Inhibitor (9): die Biaryl-Struktur der Inhibitors (9) schreibt eine rigide, zueinander senkrechte Anordnung der beiden aromatischen Systeme vor. Der distale aromatische Ring steht fast parallel zu den Seitenketten von Tyr 99 und Phe 174 der hydrophoben Tasche, während der angrenzende Benzol-Ring senkrecht dazu und parallel zur Seitenkette des Trp 215 liegt (**Abbildung 16h**). Der Isoxazol-Ring stellt die Verbindung zum Benzamidin-Rest des Inhibitors dar, der in der primären Spezifitätsbindetasche bindet. Derselbe Bindungsmodus wurde bereits in der Kristallstruktur mit Rindertrypsin beobachtet und für die Bindung mit Faktor Xa modelliert (Pruitt *et al.*, 2000).

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Sulfonamid-Stickstoffatom und dem Sauerstoffatom des Glu 97 (3.0 Å) als auch zwischen dem Amid-Stickstoffatom von Gly 216 und dem Carbonyl-Sauerstoffatom (2.7 Å) tragen zur Affinität bei.

Obwohl die Komplexstrukturen der *TripleSer217Ile227*-Variante zur Ausgangsvariante *TripleSer217Val227* strukturell gleich sind, d.h. sie zeigen alle nur die ‚down‘-Konformation, hemmen die getesteten Inhibitoren diese Variante schlechter. Auch die geringeren Umsetzungsraten der *TripleSer217Ile227*-Variante für beide Substrate ($0.25 [10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$ bzw. $0.14 [10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$) sind im Vergleich zu Trypsin ($3.04 [10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$ bzw. $1.37 [10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$) um den Faktor 14 bzw. 10 herabgesetzt, was eine Verringerung der Aktivität des Enzyms bedeutet (**Tabelle 8**).

Die *TripleSer217Ile227*-Variante kommt nur in einer Kristallform (Kristallform A, $P3_121$) bzw. der trigonalen Raumgruppe $P3_121$ vor, die in einer relativ dichten Kristallpackung mit einem Wassergehalt von nur 35 % (Matthews-Koeffizient = 1.9) auftritt. Gleichzeitig steht der Bereich der Bindetasche in nahem Kontakt zu einem symmetrieverwandten Molekül. Der Abstand der S3/S4-Bindetasche zum nächsten Molekül beträgt nur etwa 3 Å. Mehrere Experimente, in denen versucht wurde, größere Inhibitoren in die *TripleSer217Ile227*-Variante hineindiffundieren zu lassen (*soaking*), schlugen fehl, da die Kristalle in der *soaking*-Lösung in viele kleine Stücke zerbrachen. Denkbar ist, dass durch das Hineindiffundieren des Inhibitors in die relativ engen Solvenskanäle des Proteinkristalls die Ordnung im Kristall aufgebrochen und somit die Kristalle zerstört wurden.

3.3.2 TripleSer217Phe227-Variante

Der Austausch des Val mit einem Phe in Position 227 erzeugte die *TripleSer217Phe227*-Variante. Diese Variante, die noch geringere Katalyseraten zeigt als die *TripleSer217Ile227*-Variante (0.14 bzw. $0.09 [10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$ im Vergleich zu 0.25 bzw. $0.14 [10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$) (**Tabelle 8**), ist durch gleichzeitig verschlechterte Hemmkonstanten gekennzeichnet. Diese Variante kommt in einer neuen Kristallform (Kristallform C, $P2_12_12_1$), die zwar der orthorhombischen Raumgruppe zugehört, aber im Vergleich zu den Varianten aus Stubbs *et al.*, 2002, und Rauh *et al.*, 2004, andere Längen der Kristallachsen zeigt. Die Kristallstruktur der *TripleSer217Phe227*-Variante im Komplex mit Inhibitor (**1**) weist auf eine hohe Flexibilität bzw. verstärkte Destabilisierung der ‚175er‘-Schleife hin. Für die Reste 168 bis 182 kann keine strukturelle Information abgeleitet werden (**Abbildung 17a**, **Abbildung 17b**). Das Fehlen der Elektronendichte der Schleife der *TripleSer217Phe227*-Variante im Komplex mit dem kleinen Inhibitor (**1**) lässt daher eine hohe Flexibilität erkennen. Zusätzlich ist der Indol-Ring des Trp 215 im Vergleich zu den *TripleSer217Ile227*-Varianten um ca. 1 Å abgesenkt und seine Elektronendichte weniger gut definiert. Dass sich die unmittelbare Flexibilität der S1-Bindetasche auch auf etwas weiter entfernte Reste wie dem Val227 ausübt, wurde bereits in ^1H -NMR-Spektren von elastaseähnlichen Trypsin-Varianten beobachtet (Hung *et al.*, 1998). Die Situation ist

bedeutend anders, wenn man diese Variante mit den größeren Inhibitoren, die auch die S3/S4-Bindetasche einnehmen, kristallisiert hat. Hier ist jeweils die Elektronendichte der ,175er'-Schleife gut erkennbar und befindet sich in der erwünschten, Faktor X-ähnlichen ,up'-Konformation (**Abbildung 17c**), die bisher noch nicht zuvor für eine bovine *TripleSer217Xxx227*-Variante beobachtet werden konnte (vgl. Rauh *et al.*, 2002, 2003, 2004).

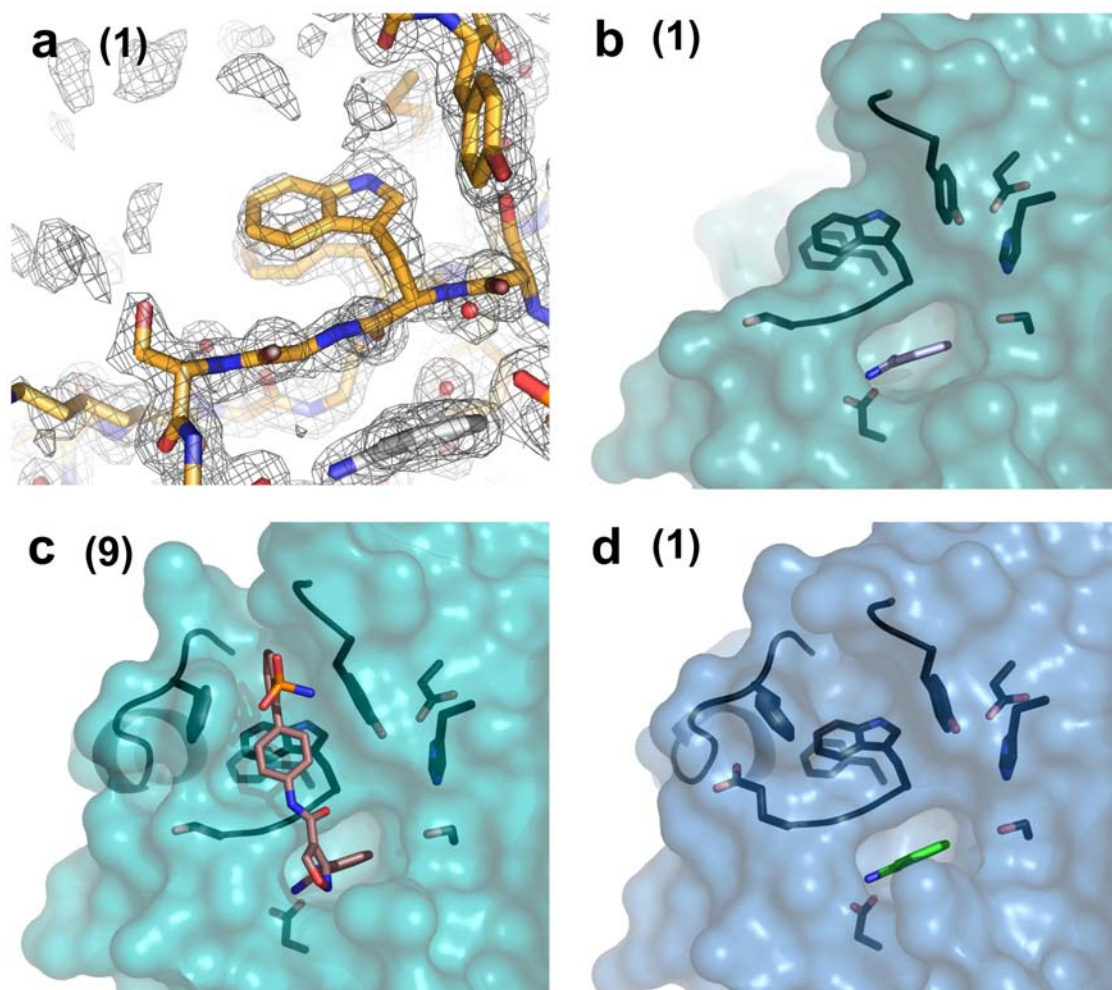


Abbildung 17 Bindungsmodi der Inhibitoren II

Die Darstellungsart ist in gleicher Weise wie in Abbildung 16. **a** und **b** zeigen jeweils die *TripleSer217Phe227*-Variante im Komplex mit **(1)**. Trotz der Einführung des Phe 227 fehlt hier (**a**) auch die Elektronendichte der ,175er'-Schleife aufgrund von Flexibilität. **c** zeigt die *TripleSer217Phe227*-Variante mit Inhibitor **(9)** in einer neuen Kristallform (Kristallform E; Raumgruppe $P6_5$). **d**: Inhibitor **(1)** im Komplex mit der *TripleGlu217Phe227*-Variante (dargestellt mit blauer Proteinoberfläche) zeigt die ,175er'-Schleife in der erwünschten ,up'-Konformation, offenbar durch stabilisierende Effekte des Glu217.

Der Inhibitor **(2)** hat hier einen alternativen Bindungsmodus (Kristallform B, $P2_12_12_1$, nicht gezeigt) gegenüber der *TripleSer217Ile227*-Variante. Die Tosylglycyl-Funktion zeigt von der hydrophoben Tasche weg und bildet Wasserstoffbrücken zur Hauptkette eines symmetrieverwandten Moleküls aus (Amid-Stickstoffatom Ser202* zu Sulfonyl-Sauerstoffatom: 2.8 Å; Amid-Stickstoffatom Gly 203* zu Carbonyl-Sauerstoffatom des Glycyl-Restes: 3.3 Å). Dennoch ist der Inhibitor deutlich definiert und formt zwei starke

Wasserstoffbrücken (2.8 Å und 2.7 Å) zu den Resten Gly 216 und Gly 219. Die ,175er'-Schleife ist in der ,up'-Konformation.

Inhibitor **(5)** bindet zu dieser Variante in ähnlicher Weise wie zur *TripleSer217Ile227*-Variante, jedoch ist die Arginyl-Seitenkette leicht verdreht und sitzt tiefer in der hydrophoben Tasche (nicht gezeigt). Die ,175er'-Schleife befindet sich, wie auch im Komplex mit den Inhibitoren **(7)**, **(8)** und **(9)** in der ,up'-Konformation.

Als basische Gruppe besitzt Inhibitor **(7)** in Position P1 eine Amidinonaphthyl-Gruppe die an ein Indol-Ringsystem in P2-Stellung geknüpft ist. Die S1_β-Bindetasche ist durch die Isopropyl-Gruppe ausgefüllt, während die Acetimidoylpiperidiny-Funktion für die Position P3/P4 bestimmt ist (Arnaiz *et al.*, 1997). Die Kokristallstruktur (Kristallform F, P3₂21, **Abbildung 16f**) von Inhibitor **(7)** mit der *TripleSer217Phe227*-Variante zeigt, dass die Amidinonaphthyl-Gruppe in der S1-Bindetasche sitzt und vom N 9-Atom eine schwache Wasserstoffbrücke (3.7 Å) zum Carbonyl-Sauerstoffatom von Glu 97 ausbildet, analog zu der Reihe von DX9065a-Inhibitoren für Trypsin (Stubbs *et al.*, 1995) und Faktor Xa (Brandstetter *et al.*, 1996). Im Unterschied zu anderen Strukturen hat sich der aromatische Ring von Rest Tyr 99 geringfügig geneigt, dass die S3/S4-Bindetasche etwas schmaler wird.

Anhand der Kristallstruktur kann vermutlich die durchgehend gute Hemmung der Varianten durch Inhibitor **(7)** durch mehrere hydrophobe Wechselwirkungen abgeleitet werden: das Piperidin-Ringsystem in der hydrophoben Tasche, die Isopropyl-Seitenkette in der S1_β-Bindetasche und der Naphthyl-Rest in der primären Spezifitätsbindetasche S1.

Bezüglich der Struktur und den Bindungseigenschaften ist Inhibitor **(7)** ähnlich dem Inhibitor **(8)**. Die Carboxyl-Gruppe von Inhibitor **(8)** ist dem Lösungsmittel zugewandt (Kristallform H, C222₁, **Abbildung 16g**), während der Acetimidoyl-Rest sich über P3/P4 erstreckt, wodurch sich Wasserstoffbrücken über die distale Imino-Gruppe zum Carbonyl-Sauerstoffatom von Glu 97 ausbilden.

Der Komplex aus der *TripleSer217Phe227*-Variante und Inhibitor **(9)** kristallisierte in zwei verschiedenen Kristallformen. Die Kristallform D (P3₂21) wurde auch bei anderen Varianten beobachtet. Die höher symmetrische, hexagonale Kristallform E (P6₅) ist bei dieser Variante neu (**Abbildung 17c**). Die zwei verschiedenen Kristallformen wirken sich auch auf die Ligandenbindung aus: In einer Überlagerung der Strukturen der *TripleSer217Phe227*-Variante und der *TripleSer217Ile227*-Variante kann man erkennen, dass durch die Ausbildung der ,up'-Konformation der ,175er'-Schleife Inhibitor **(9)** innerhalb der S3/S4-Bindetasche um ca. 1.8 Å in Richtung des Tyr 99 verschoben ist (nicht gezeigt).

3.3.3 TripleGlu217Ile227-Variante

Die Einführung der Val227Ile-Mutation in die *TripleGlu217Val227*-Variante, oder anders ausgedrückt, die Ser217Glu-Mutation in die *TripleSer217Ile227*-Variante lieferte die

TripleGlu217Ile227-Variante. Trotz der Einführung einer größeren Seitenkette in Position 227 durch das Ile analog zu Faktor Xa, zeigt diese Variante verschiedene Konformationen der flexiblen Schleife. Die Kokristalle mit den Inhibitoren **(1)** und **(2)** zeigen die ‚down‘-Konformation (nicht gezeigt). Die erwartete Wasserstoffbrücken-Wechselwirkung zwischen den Resten Ser 172 und Glu 217 ist hier nicht zu beobachten. Zum einen ist die Seitenkette von Glu 217 um den Torsionswinkel χ_1 von 120° gedreht. Ferner ist die α -Helix zwischen den Resten Asp 165 und Ala 171 bei der *TripleGlu217Ile227*-Variante in der ‚down‘-Konformation aufgeweitet und verkürzt, so dass sich die Position von Ser 172 um ca. 3.1 Å nach außen verschoben hat. Dadurch sind in dieser Gruppierung die Seitenketten der Reste Ser 172 und Glu 217 weit von einander entfernt (ca. 10 Å). Die Bindungsmodi der Inhibitoren **(1)** und **(2)** sind mit denen der *TripleSer217Ile227*-Variante identisch. Daher sind für diese Strukturen keine Abbildungen gezeigt.

Die erwünschte Faktor Xa-ähnliche ‚up‘-Konformation wird jedoch in den Strukturen mit den Inhibitoren **(5)** und **(9)** erhalten (nicht gezeigt). Bei beiden ist die γ -Carboxyl-Gruppe von Glu 217 in ein Wasserstoffbrücken-Netzwerk mit den Seitenketten von Ser 172 (2.7 Å) und Lys 224 (2.7 Å) eingeschlossen, was offensichtlich zur Stabilisierung der ‚175er‘-Schleife beiträgt. Der Bindungsmodus von Inhibitor **(5)** ist hier im Gegensatz zu dem der *TripleSer217Phe227.F5*-Struktur leicht verändert, so dass der Benzyl-Rest nicht mehr in der S1 $_{\beta}$ -Tasche bindet, sondern zum Solvens zeigt (s.o.). Dies ist möglicherweise der anderen Kristallform (Kristallform I, P3 $_{21}$,) in der der Komplex vorliegt, zuzuschreiben, in der Art, dass kein Kristallkontakt in dieser Region vorkommt und dadurch Platz für Konformationsänderungen bleibt. Im Komplex mit Inhibitor **(9)** kristallisiert die *TripleGlu217Ile227*-Variante in der Kristallform E (P6 $_5$) wie auch die *TripleSer217Phe227*-Variante; strukturell sind diese beiden identisch.

Die *TripleGlu217Ile227*-Variante wird von den Inhibitoren **(5)** und **(9)** etwa gleichermaßen wie die *TripleGlu217Val227*-Variante gehemmt (**Tabelle 9**), aber wesentlich besser als die Varianten ohne Mutation an Position 217 (Ser in Trypsin, Glu in Faktor Xa). Auch die Umsetzungsraten der Substrate ist um den Faktor 4 bis 8 höher (1.04 [10 6 M $^{-1}$ s $^{-1}$] und 0.77 [10 6 M $^{-1}$ s $^{-1}$]) als bei den Varianten ohne Mutation an Position 217 (**Tabelle 8**).

3.3.4 Triple Glu217Phe227-Variante

Mehrere sich gegenseitig beeinflussende Effekte zeigen sich in der *TripleGlu217Phe227*-Variante in der Form, dass sich in allen Kristallstrukturen dieser Variante nur die erwünschte ‚up‘-Konformation gezeigt hat, ergänzt durch Faktor Xa-ähnliche Hemmkonstanten. Sogar der Komplex mit Inhibitor **(1)**, bei dem die S3/S4-Bindetasche unbesetzt bleibt, zeigt die ‚up‘-Konformation und Faktor Xa-ähnliche K $_i$ -Werte. Kristalle der Variante mit diesem Inhibitor kristallisierten in einer Kristallform mit der Raumgruppe P1 mit 16 Molekülen in der asymmetrischen Einheit. P1 ist die Raumgruppe mit der niedrigsten Symmetrie. Die Kristalldaten lieferten eine Auflösung von nur 2.9 Å. Dennoch

konnte die Struktur zufriedenstellend gelöst und die Konformation der flexiblen Schleife entsprechend interpretiert werden (**Abbildung 17d**).

Die *TripleGlu217Phe227*-Variante im Komplex mit Inhibitor (**2**) kommt auch in der ‚up‘-Konformation vor; der Tosyl-Rest des Inhibitors zeigt vom Enzym weg (nicht gezeigt). Ähnlich wie bei der *TripleSer217Ile227*-, *TripleSer217Phe227*- und *TripleGlu217Ile227*-Variante trägt der Tosyl-Rest offenbar nicht signifikant zur Bindungsaffinität des Inhibitors bei.

Der Bindungsmodus von Inhibitor (**5**) mit der *TripleGlu217Phe227*-Variante ist ähnlich wie bei der *TripleSer217Ile227*-Variante, jedoch mit einer geringfügig geänderten Orientierung des Benzyl-Restes (**Abbildung 18**). Bei den anderen Varianten ist der Benzyl-Rest von Inhibitor (**5**) in der S1_β-Bindetasche lokalisiert. Dagegen ist dieser Rest in der Struktur der *TripleGlu217Phe227*-Variante um ca. 120° aus der Tasche herausgedreht und zeigt in einen Solvenskanal (nicht abgebildet).

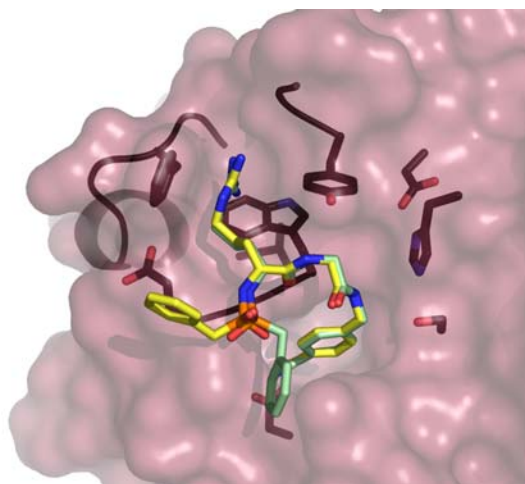


Abbildung 18 Alternativer Bindungsmodus des Inhibitors (5)

Der Inhibitor (**5**) zeigt verschiedene Bindungsmodi: Mit der *TripleSer217Ile227*-Variante (hellgrün) ist der Benzyl-Rest in der S1_β-Bindetasche platziert, während in der *TripleGlu217Phe227*-Variante (gelb) der Rest um einen Torsionswinkel um etwa 120° gedreht ist.

Der Bindungsmodus mit Inhibitor (**9**) ist ebenfalls analog zur *TripleGlu217Ile227*-Variante. Der Wechsel der Konformation der Schleifen von der ‚down‘- in die ‚up‘-Konformation geht mit einer leichten Abweichung der Orientierung der Peptidbindung zwischen den Resten Gly 216 und Glu 217 einher. Im Vergleich zur *TripleSer217Val227*-Variante mit Inhibitor (**9**), die in der ‚down‘-Konformation vorliegt, neigt sich die beteiligte Carbonyl-Gruppe um 1.23 Å in Richtung der S1-Bindetasche, während das Amid-Stickstoffatom um 0.43 Å in die andere Richtung verschoben ist (nicht dargestellt).

Die enzymkinetischen Daten für die *TripleGlu217Phe227*-Variante nähern sich weitgehend den Werten für Faktor Xa an (**Tabelle 8**). Die Umsetzung für das Pefachrome tPA® Substrat hat die gleiche Größenordnung; für das Substrat Pefachrome FXa® ist die Rate fast um den Faktor 3 höher. Die Hemmkonstanten haben sich im Vergleich zu den

vorangegangenen Varianten sehr deutlich dem Faktor Xa genähert. Für die Inhibitoren **(1)**, **(4)**, **(6)**, und **(7)** sind sie sogar nahezu identisch.

In **Abbildung 19** ist ein Vergleich der K_i -Werte von Rindertrypsin (braun), der Varianten und von Faktor Xa (dunkelblau) mit den verschiedenen Inhibitoren dargestellt. Die K_i -Werte sind logarithmisch aufgetragen. Die *TripleSer217Ile227*-Variante (orange) und die *TripleSer217Ile227*-Variante (gelb) zeigen wie die Ausgangsvariante *TripleSer217Val227*-Variante (rot) und Rindertrypsin (braun) ein annähernd gleiches Profil. Die *TripleGlu217Val227*-Variante (grün) und die *TripleGlu217Ile227*-Variante (violett) werden etwas besser gehemmt. Eine deutliche Annäherung der K_i -Werte an die des Faktor Xa ist bei der *TripleGlu217Phe227* zu erkennen. Anhand der K_i -Werte und der strukturellen Eigenschaften (‘up’-Konformation) dieser Variante kann man von einer Trypsin-Variante mit Faktor Xa-ähnlichen Eigenschaften durch die erfolgreiche sterische Kontrolle der flexiblen ‘175er’-Schleife sprechen.

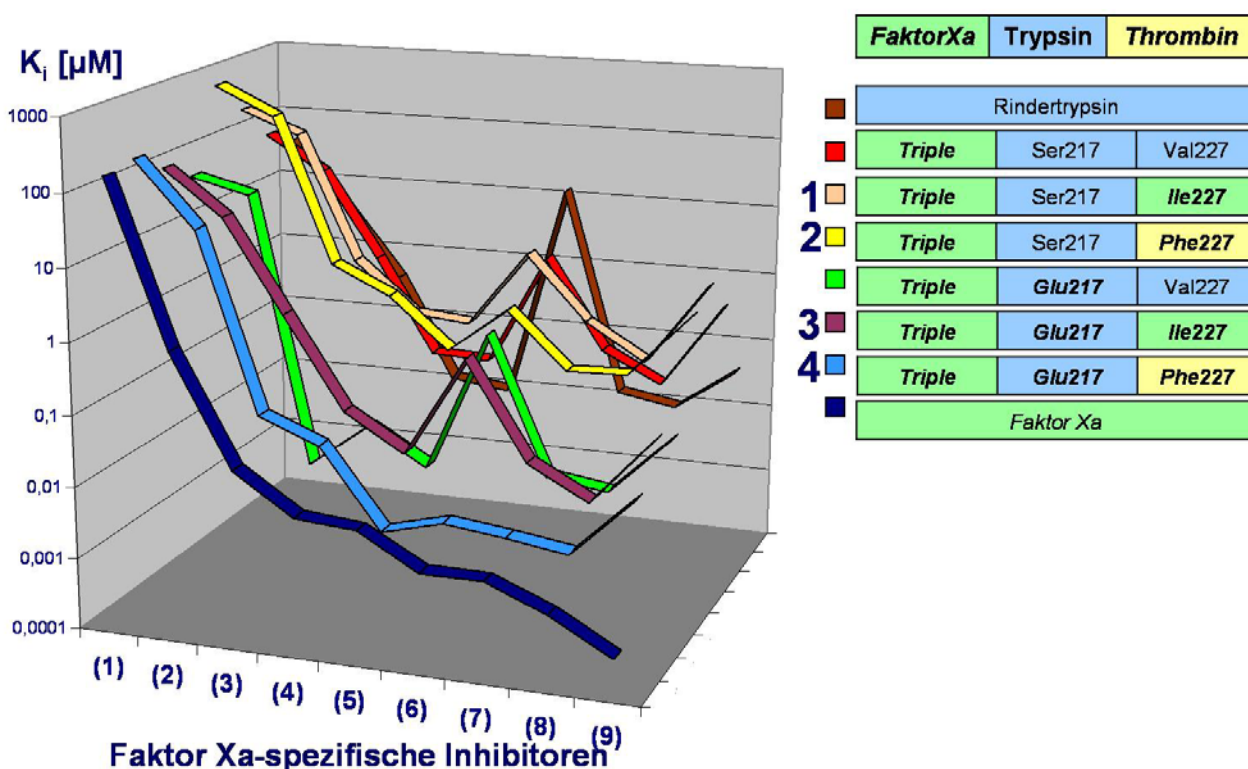


Abbildung 19 Grafischer Vergleich der K_i -Werte

Darstellender Vergleich der K_i -Werte der Trypsin-Varianten mit den verschiedenen Inhibitoren in logarithmischer Auftragung. Das Profil der *TripleGlu217Phe227*-Variante (hellblau) entspricht nahezu dem des Faktor Xa. Alle anderen Varianten zeigen ein eher trypsinähnliches Profil (braun).

3.3.5 Bildung eines Isoaspartat-Restes bei Aminosäure Asn 115

Die *TripleGlu217Phe227*-Variante, die mit dem Inhibitor **(2)** zusammen kristallisierte, kam in der Kristallform B mit der Raumgruppe $P2_12_12_1$ und den Zellkonstanten $a = 54.5 \text{ \AA}$, $b = 57.5 \text{ \AA}$, $c = 67.0 \text{ \AA}$, und $\alpha, \beta, \gamma = 90^\circ$ vor. Die Struktur konnte bis zu einer Auflösung von $1.9 \text{ \AA}$ gelöst werden. Bei der Auswertung der Daten wurde am Rest Asn 115 positive

Elektronendichte um den Bereich der Hauptkette und negative Elektronendichte an der Position der Seitenkette beobachtet. Nach den ersten Verfeinerungszyklen zeigte sich, dass es sich um einen D-Isoaspartat-Rest handelt (**Abbildung 20**). Interessanterweise zeigten andere Kristalle aus demselben Tropfen eindeutig keine Modifizierung am Rest 115. Es sind bereits einige Strukturen mit L-Isoaspartat- und D-Aspartat-Resten bekannt (Di Marco *et al.*, 1997; Rester *et al.*, 2000), für deren Entstehung Proteinalterung, ein sehr langsames Kristallwachstum (über Monate) und Kontakte zwischen den Molekülen im Kristall diskutiert werden. Aufgrund der rekombinanten Gewinnung und der *in vitro*-Rückfaltung aller Varianten, ist davon auszugehen, dass diese posttranslationale Modifikation des Proteins *in vitro* entstanden ist. Zudem erschienen die ersten Kristalle schon nach wenigen Tagen und wuchsen innerhalb von 2 Wochen zu einer Größe von bis zu 0.4 mm heran, bis sie vermessen wurden.

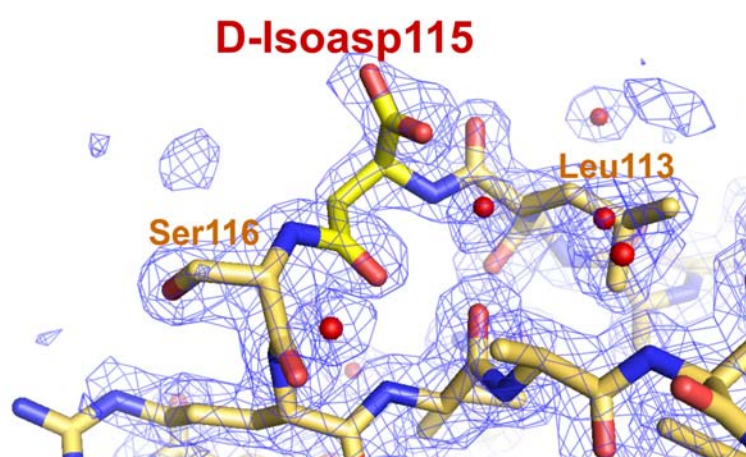


Abbildung 20 D-Isoaspartat 115

Dargestellt ist die Struktur der Reste Leu113, las 115 (Isoaspartat) und Ser 116 in der *TripleGlu217Phe227*-Variante. Die Elektronendichte (blaues Netz) ist gut definiert, so dass im Bereich des Restes 115 deutlich ein D-Isoaspartat (gelbe sticks) interpretiert werden kann.

3.4 Diskussion der Teile A und B: Hinderung der Proteinflexibilität

Die Ergebnisse der Kapitel 03.2 und 3.3 zeigen, dass sich die Proteinflexibilität durch die angestrebten Strategien steuern lässt.

Für die SSCI-Variante wurde von der SSFI-Variante, die auf Arbeiten von Rauh *et al.*, 2002 und 2004 zurückgeht, ausgegangen. Die Kristallstruktur der SSCI-Variante (**Abbildung 15**) zeigt keine eindeutige Konformation der ,175er'-Schleife, wie auch in einigen Ausgangsvarianten. Dies war zu erwarten, da die neu eingeführte Thiol-Gruppe zwar polar und reaktiv ist, jedoch kleiner als der Phenyl-Ring des Phe 174 und somit einen geringen bis keinen sterischen Einfluss auf die Konformation der flexiblen Schleife ausübt.

Für die SSCI-Variante wurde in einer Messreihe (Stürzebecher *et al.*, 1997) in Gegenwart des Inhibitors (**6**) eine Inhibitionskonstante von 250 μM bestimmt, die um den Faktor 20 höher als für Rindertrypsin (12 μM) und um 5 Potenzen höher als für Faktor Xa (0.02 μM) liegt. In Arbeiten von Rauh *et al.*, 2004, wurden mit Varianten, die anstelle des Cysteins

ein Tyr, Trp, Ala oder Arg enthielten, K_i -Werte von 19 μM , 12 μM , 97 μM bzw. $>1000 \mu\text{M}$ für den Inhibitor **(6)** erhalten, mit denen der für die SSCI-Variante ermittelte K_i -Wert gut korrespondiert. Die Vermutung, dass ein umfangreicherer Rest in Position 174 die Flexibilität reduzieren kann, bestätigt sich bei der SSCI-Variante in der gut definierten Elektronendichte der flexiblen Schleife, nachdem das Protein mit der Quecksilberverbindung PCMB reagiert hat. Die Steuerung der aufgetretenen Flexibilität ist somit durch posttranslationale Modifizierung *in vitro* möglich.

Der Versuch der sterischen Steuerung durch die Einführung des Ile 227 in die *TripleSer217Val227*-Variante, welcher die *TripleSer217Ile227*-Variante hervorbrachte, sollte eine Proteinase erzeugen, die durch erhöhte strukturelle Ähnlichkeit mit Faktor Xa, oder anders ausgedrückt, durch die sperrigere Seitenkette in Position 227 die ‚up‘-Konformation begünstigt, weil sie keinen Platz für Konformationsänderungen lässt. Überraschenderweise übt die zusätzliche Methyl-Gruppe (Mutation Val227Ile) in diesem Fall keinen Effekt auf die Konformation der flexiblen Schleife aus. Es ist bekannt, dass sich die physikochemischen Eigenschaften der Aminosäuren Ile, Leu und Val sehr ähnlich sind und durch ihre gegenseitige Substitution kaum Unterschiede zu erwarten sind (Brandon *et al.*, 1999). Diese Kenntnis hat sich in der Struktur der *TripleSer217Ile227*-Variante bestätigt. Alle bestimmten Strukturen zeigen die ‚down‘-Konformation. Allerdings weisen diese Varianten eine deutlich verminderte Affinität für alle getesteten Inhibitoren auf. Im Vergleich zur Ausgangsvariante *TripleSer217Val227* zeigt die *TripleSer217Ile227*-Variante eine zwei- bis sechsfache Abnahme der Affinität für die getesteten Inhibitoren. Zwar wird eine deutliche Erhöhung der k_{cat} - und K_m -Werte beobachtet, jedoch zeigt der Quotient aus beiden, dass die Umsatzrate deutlich reduziert ist und somit sich ein bisweilen noch nicht deutbarer Effekt zeigt. Die Ergebnisse aus den Röntgenstrukturdaten zeigen, dass die zusätzliche Mutation in Position 227 alleine keinen Einfluss auf die Struktur hat, wohl aber auf die K_i -Werte. Mit weiteren strukturaufklärenden Methoden könnten weitere Erklärungen für die Diskrepanz zwischen Struktur- und Affinitätsdaten erhalten werden (z.B. NMR).

Eine kristallografische Messung wird häufig und irrtümlich als ein ‚Schnappschuss‘ einer einzelnen Konformation betrachtet, die in einem Kristall eingeschlossen ist. In Wirklichkeit ist sie eine zeitgemittelte Elektronendichteverteilung aller Moleküle eines Kristalls mit merklichen Differenzen der Schleifen und Seitenkettenkonformationen der einzelnen Moleküle.

Bei der Betrachtung verschiedener Proteinasevarianten, die sich nur geringfügig unterscheiden, wie die in dieser Arbeit untersuchten Rindertrypsin-Varianten, ist die Bestimmung der Hemmkonstanten viel empfindlicher und kann mehr Auskunft über geringe Unterschiede geben, als die Röntgenstrukturanalyse.

Bei der *TripleSer217Ile227*-Variante erscheint es, dass auch die Inhibitoren keinen Einfluss auf die ‚175er‘-Schleifen-Konformation ausüben. Der kleine und relativ schwache Inhibitor **(1)** (K_i : 227 μM) besetzt nur die S1-Bindetasche und übt keine direkte

Wechselwirkung mit der flexiblen Schleife aus. Die größeren Inhibitoren, die die gesamten Bindetaschenbereiche besetzten, bis hin zu den hochaffinen Inhibitoren wie Inhibitor **(8)** (K_i : 0.14 μM), zeigen zwar unterschiedliche K_i -Werte, haben keinen Effekt bezüglich der Konformation der flexiblen Schleife. Ein weiterer Hinweis auf nur eine Konformation ist, dass Trypsin gewöhnlich in vielen verschiedenen Formen kristallisiert (Stubbs *et al.*, 2002). Das Vorkommen einer einzigen Kristallform der verschiedenen Komplexstrukturen der *TripleSer217Ile227*-Variante, nämlich der Kristallform A, P3₁21, deutet daher auf nur eine einzige Konformation, nämlich auf die ‚down‘-Konformation hin.

Bei der *TripleSer217Phe227*-Variante wird der sterische Effekt durch die voluminöse Seitenkette des Phe 227 verstärkt und zeigt erstmals in einer bovinen *TripleSer217Xxx227*-Variante einen Effekt bezüglich der flexiblen Schleife (**Abbildung 16g**): Einerseits ist die Hemmung der *TripleSer217Phe227*-Variante durch die Inhibitoren **(1)** und **(2)** noch schlechter geworden (695 μM bzw. 290 μM). Ferner zeigt die Struktur mit Inhibitor **(2)** noch die ‚down‘-Konformation. Im Komplex mit dem kleinen Inhibitor **(1)** ist die flexible Schleife insofern destabilisiert, dass die Elektronendichte in diesem Bereich nicht ermittelbar ist. Andererseits scheinen die Inhibitoren **(5)**, **(7)**, **(8)** und **(9)** einen stabilisierenden Effekt auszuüben, da sich in den Komplexstrukturen schließlich die erwünschte ‚up‘-Konformation der Schleife zeigt. Ergänzt wird das Phänomen durch die im Vergleich zu den Varianten *TripleSer217Val227* und *TripleSer217Ile227* nicht verschlechterten K_i -Werte.

Der sperrige Phe-Rest in Position 227 kann also die Schleife in die Faktor Xa-ähnliche Konformation ‚zwingen‘. Die Varianten *TripleSer217Ile227* und *TripleSer217Phe227* sind sich in den enzymkinetischen Daten recht ähnlich, unterscheiden sich jedoch signifikant in ihrer Struktur der Bindetasche (*TripleSer217Ile227* ist ausschließlich in der ‚down‘-Konformation; *TripleSer217Phe227* kann sowohl in der ‚down‘- wie in der ‚up‘-Konformation vorkommen). Nicht nur die Konformationen der Schleife zwischen den beiden Varianten sind unterschiedlich, sondern auch die Position der Seitenkette von Trp 215 weicht geringfügig um 1-2 Å voneinander ab, was eine Flexibilität andeutet.

Im Bereich der Bindetasche kennt man auch bei der verwandten Proteinase Thrombin Flexibilitäten, welche durch allosterische Effekte hervorgerufen wird (Huntington *et al.*, 2003). Thrombin wird durch die An- bzw. Abwesenheit von Natriumionen reguliert. Bindet ein Natriumion koordinativ über die Reste 217 bis 225 der Bindetasche zusammen mit Wassermolekülen (Carter *et al.*, 2004; Pineda *et al.*, 2006), spricht man von der aktiven, ‚schnellen‘ Form des Thrombins, welches Fibrinogen rasch zu Fibrin umwandelt. Sind weder Inhibitoren noch Natriumionen anwesend, wie in den Strukturen von Carter und Pineda gezeigt, kommt es zu einer konzertierten Bewegung der Disulfidbrücke zwischen Cys 168 und Cys 182 sowie den Resten Phe 227, Trp 215 und Trp 60d, so dass die S2- und die Arylbindetaschen sterisch blockiert sind. Thrombin ist dann in seiner ‚langsamen‘ Konformation und wenig aktiv. Die geringfügige Abweichung des Trp 215 in der

TripleSer217Phe227-Variante könnte durch einen nicht sichtbaren Einfluss der *Ile227Phe*-Mutation hervorgerufen sein, so dass sich die *TripleSer217Phe227*-Variante in einem eher ‚langsameren‘ Zustand befindet. Die relativ schlechten K_i -Werte könnten darauf auch einen Hinweis sein.

Wie bei der *TripleSer217Ile227*-Variante beobachtet, können Mutationen in Proteinen ebenfalls einen Einfluss auf das Gleichgewicht der enzymatischen Reaktion ausüben. Dass der Austausch von einzelnen Aminosäuren eine stärkere Substratbindung im Verhältnis zum Wildtyp bewirken kann, aber zugleich die katalytische Wirkung erheblich verlangsamt, zeigten bereits zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Trypsinen (Craik *et al.*, 1985). Die verstärkte Bindung der Substrate ist demnach wohl das Ergebnis einer konformellen Umorientierung, durch die der katalytische Prozess in seiner Geometrie oder Dynamik gestört wird. Diesen Effekt bestätigen die Trypsin-Varianten von Rauh (Rauh *et al.*, 2004) und die *TripleSer217Ile227*-Variante in Form der ‚down‘-Konformation mit gleichzeitig verschlechterten Hemmkonstanten.

Es kommt aber auch vor, dass die Substrate einen veränderten Bindungsmodus aufweisen. Dadurch wird ihre spaltbare Bindung relativ zum katalytischen Zentrum in eine falsche Position orientiert. Hinweise darauf geben die unterschiedlichen Bindungsmodi eines Inhibitors mit derselben Trypsin-Variante am Beispiel von Inhibitor **(5)** mit den hier beschriebenen Trypsin-Varianten (**Abbildung 18**) und Inhibitor **(3)** mit Rindertrypsin (Rauh *et al.*, 2003).

Eine bedeutende Rolle im Bereich, der zur Bindetasche angrenzt, spielt der Rest Glu 217. In vorangegangenen Studien (Rauh *et al.*, 2004) wurde bereits gezeigt, dass der Austausch eines Ser gegen ein Glu in Position 217 (*TripleGlu217Val227*-Variante) eine Wasserstoffbrückenbildung des Ser 172 mit dem Glu in der flexiblen Schleife zulässt. Diese intramolekulare Wechselwirkung stabilisiert offenbar die ‚175‘er-Schleife. Die Kombination der beiden Mutationen Ser217Glu und Val227Ile ergab die *TripleGlu217Ile227*-Variante, die beide Merkmale besitzen sollte, um die Faktor Xa-ähnliche Konformation zu erhalten, die jedoch verschiedene Konformationen und schlechtere K_i -Werte zeigte als die *TripleGlu217Val227*-Variante.

Obwohl Strukturen der Varianten *TripleSer217Ile227*, *TripleSer217Phe227* und *TripleGlu217Ile227*, die in der ‚down‘-Konformation vorkommen, alle nur eine Konformation zeigen, unterscheiden sie sich in ihren K_i -Werten im Vergleich zum Rindertrypsin oder Faktor Xa erheblich (über 3-4 Potenzen, siehe **Tabelle 9**).

Im Gegensatz dazu wurde bei der *TripleGlu217Phe227*-Variante nun die stark destabilisierende Mutation (Val227Phe) mit einer sich mittelmäßig ausprägenden Mutation (Ser217Glu) kombiniert. Das Ergebnis bzw. Zusammenwirken sämtlicher Mutationen im Rindertrypsin erzeugte in Form der *TripleGlu217Phe227*-Variante einen neuen Phänotyp. Die kooperativen Effekte der verschiedenen Mutationen erzielten eine nahezu vollwertige Faktor Xa-ähnliche Trypsin-Variante, sowohl strukturell als auch bei den Werten der

Hemmkonstanten. Das Beispiel zeigt, wie komplex sich Proteinmutationen auswirken können und dass diese bei der Interpretation von Proteinvarianten berücksichtigt werden müssen.

Die Trypsin-Varianten, die im Rahmen dieser Arbeit kristallisiert wurden, traten in verschiedenen Kristallformen auf, wobei einige häufig vorkommen (Kristallformen A, B und E) und manche nur einmalig auftraten (Kristallformen D, G und H). So findet man die *TripleSer217Ile227*-Variante immer nur in Kristallform A (P3₁21). Diese Kristallform tritt auch bei der *TripleGlu217Ile227*-Variante auf. Sie zeichnet sich durch enge Kristallkontakte im Bereich der Bindetasche aus. Durch diese dichte Kristallpackung lässt sich erklären, dass diese Kristallform nur die ‚down‘-Konformation zulässt. Diese Behauptung wird durch die Ergebnisse der Strukturen in derselben Kristallform bei Rauh *et al.*, 2004, gestützt. Auch bei Kristallform B (P2₁2₁2₁) sind relativ enge Kristallkontakte im Bereich der Bindetasche zu beobachten, die jedoch eine ‚up‘-Konformation der flexiblen Schleife bei den Varianten *TripleSer217Phe227*, *TripleGlu217Ile227* und *TripleGlu217Phe227* jeweils zusammen mit Inhibitor (**2**) zulassen.

Sehr ähnlich untereinander sind sich die Kristallformen D, F und I, die sich nur durch die Länge der Kristallachse c unterscheiden. Es kommt jedoch nicht vor, dass bei einer Kristallform verschiedene Konformationen der flexiblen Schleife auftreten.

In der Vergangenheit wurde bereits erfolgreich Rattentrypsin in eine Proteinase mit Chymotrypsin-ähnlichen Eigenschaften umgewandelt (Hedstrom *et al.*, 1992). Dabei wurden 15 Reste in der S1-Bindetasche und zusätzliche Reste in zwei weiteren Schleifen ausgetauscht, die zum gewünschten Ergebnis führten. Tauscht man bei Rattentrypsin in denselben Positionen die offenbar spezifitätsbestimmenden Reste mit denen der verwandten Proteinase Elastase aus, erhält man nicht zu 100% die erwarteten Elastaseeigenschaften, sondern die Ausgangsproteinase und die Variante unterscheiden sich signifikant in den k_{cat}/K_m -Werten (Hung *et al.*, 1998).

Ähnlich verhalten sich die untersuchten Rindertrypsin-Varianten *TripleSer217Ile227*, *TripleSer217Phe227* und *TripleGlu217Ile227* anhand ihrer enzymkinetischen Ergebnisse gegenüber Rindertrypsin. Wie diese Untersuchungen andeuten und die Kristallstrukturdaten zeigen, wird dies durch Instabilitäten bzw. Flexibilitäten der Bindetasche hervorgerufen.

Es konnte bei Hung *et al.*, 1998, gezeigt werden, dass sich die Instabilitäten bei Trypsin-Elastase-Mutanten im Bereich der Bindetasche anhand eines ¹H-NMR-Spektrums nachweisen lassen, welche wiederum analog zu Resonanzunterschieden zwischen Trypsinogen und Trypsin sind (Perkins *et al.*, 1980). Diese und die aus der Arbeit hervorgegangenen Beobachtungen zeigen, dass die strukturellen Eigenschaften, die die Spezifität für eine bestimmte Proteinase ausmachen, sich nicht eins zu eins auf eine noch so eng verwandte Proteinase übertragen lassen, sondern noch weitere, noch wenig betrachtete Parameter dafür verantwortlich sind. Jede unterschiedliche Spezifität erfordert

somit eine einmalige strukturelle Beschaffenheit. Dies macht sich besonders zwischen der beiden Rindertrypsin-Varianten *TripleSer217Phe227* und *TripleGlu217Phe227* bemerkbar.

3.4.1 Posttranslationale Modifikationen

Die nichtenzymatische Deamidierung von Asparaginsäure- und Asparagin-Resten ist bei Proteinen, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine weit verbreitete Reaktion. Diese posttranslationalen Modifikationen können mehr oder weniger tiefgreifende Auswirkungen auf das Protein und seine Funktion haben, z.B. beim Zellalterungsprozess oder bei seiner Oligomerisierung. So ist bekannt, dass Tubulin *in vivo* ständig einer Isoaspartat-Bildung unterworfen ist (Najbauer *et al.*, 1996) und dass ortsgerichtete Deamidierungen und Isoaspartat-Bildungen bei der Di- und Trimerisierung von Filamenten des *tau*-Proteins eine Rolle spielen. Entsprechende posttranslationale Modifikationen konnten für das β -Amyloid-Peptid aus Gehirnzellen eines an Alzheimer erkrankten Patienten nachgewiesen werden (Roher *et al.*, 1993). Um diesen Schäden entgegenzuwirken, haben Organismen verschiedene enzymatische Mechanismen entwickelt. Das im Zytosol vorkommende Protein L-Isoaspartat-(D-Aspartat)-O-Methyltransferase initiiert einen Reparaturmechanismus, der die Umwandlung von L-Isoaspartat zu L-Aspartat bewirkt (Brennan *et al.*, 1994).

Obwohl die Existenz dieser Prozesse bekannt ist, sind nur wenige strukturelle Informationen darüber verfügbar. Die modifizierten Aminosäuren liegen zudem in Bereichen, die relativ flexible Segmente der Peptidkette darstellen. Daher ist es nicht ungewöhnlich, dass schlecht definierte Elektronendichten aus röntgenkristallografischen Messungen in diesen Abschnitten die Existenz der alternativen Verknüpfungen verbergen. Als erster konnte Kossiakoff (1988) durch Neutronendiffraktionsexperimente zeigen, dass gealtertes Trypsin drei deamidierte Positionen (Asn 48, Asn 95 und Asn 115) aufwies. Darüber hinaus wurden u.a. ein L-Isoaspartat für Asp 101 von Lysozym aus Hühnereiweiß (Noguchi *et al.*, 1998) und für und ein D-Aspartat für Asn 115 von Schweine- β -Trypsin (Di Marco *et al.*, 1997, Rester *et al.*, 2000) strukturell beschrieben.

Aufgrund des rekombinanten Ursprungs der Trypsin-Varianten gilt es als gesichert, dass die posttranslationale Isomerisierung des Asn 115 in der *TripleGlu217Phe227*-Variante *in vitro* entstanden ist. Von begünstigender Wirkung könnte das Imidazol, welches im Kristallisationspuffer enthalten ist, sein. Imidazol kann, wie auch benachbarte Histidin-Reste innerhalb eines Proteins, die Deamidierungsreaktion begünstigen, da es sowohl als Protonenakzeptor als auch als -donor fungieren kann (Brennan *et al.*, 1995).

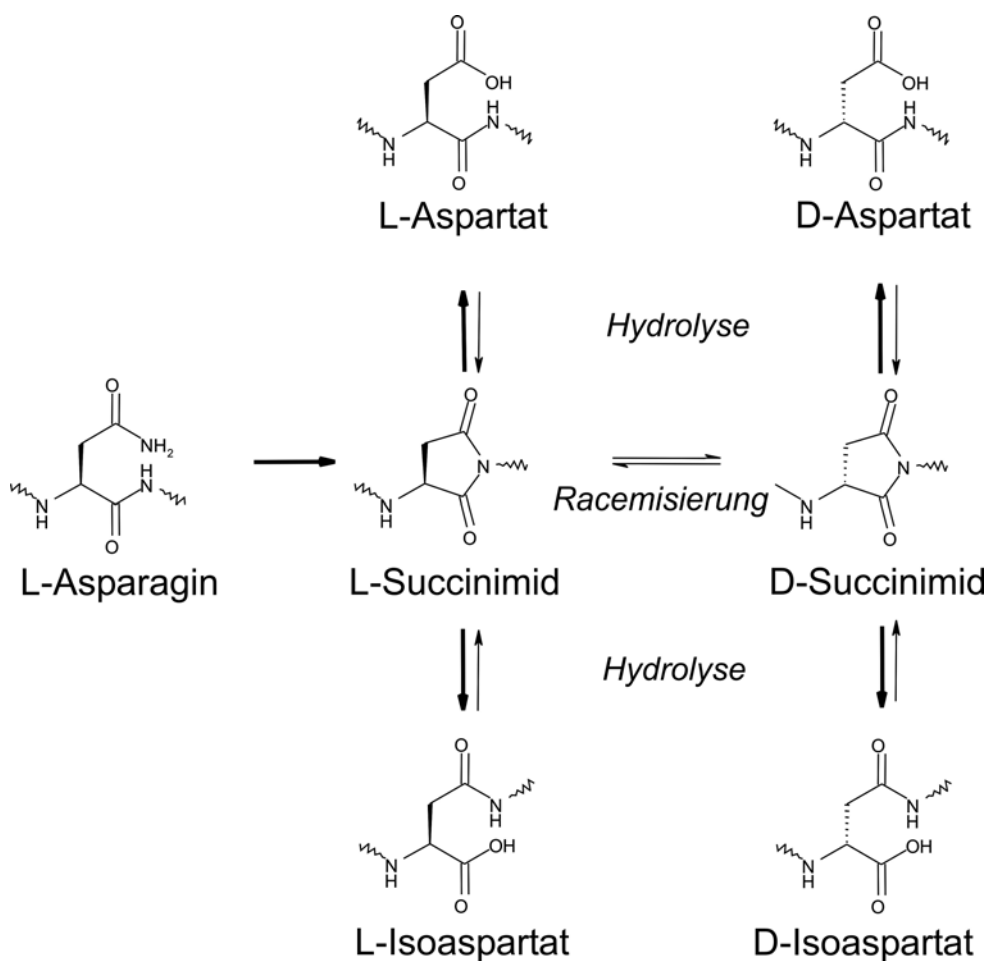


Abbildung 21 Schema der spontanen Deamidierung, Isomerisierung und Racemisierung von Asparagin- und Aspartat-Resten (nach Watanabe *et al.*, 1999).

L-Asparagin und L-Asparaginsäure können über ein Succinimidintermediat durch Racemisierung und Hydrolyse zu einem L-Isoaspartat, D-Aspartat und D-Isoaspartat reagieren.

Diese Reaktion wurde auch häufig bei Asn-Ser-Sequenzen, die in flexiblen Domänen eines Proteins lokalisiert sind, beobachtet (Watanabe *et al.*, 1999). Eine solche Sequenz findet sich auch in der Trypsin-Variante: nach dem modifizierten Asn 115 folgt Ser 116, beide befinden sich in einer Schleife an der Oberfläche des Proteins (**Abbildung 20**). Eine weitere Tatsache, die Hinweise zu einer Isoaspartat-Bildung liefert, ist das basische Milieu, in dem der Kristall gewachsen war (0.1M Imidazol, pH 8.0, 0.1M Ammoniumsulfat, 30% PEG).

Andererseits hat die modifizierte Stelle in der Trypsin-Variante in der Kristallform dieser Kristallstruktur (Kristallform B, P2₁2₁2₁) keine nahen Kristallkontakte, sondern eindeutig Kontakt zum Lösungsmittel im Kristall. Falls Protein-Protein-Kontakte die Isomerisierung ausgelöst haben, müsste die Umwandlung an dieser Stelle schon vor der Kristallformation stattgefunden haben. Weitere Kristalle aus demselben Kristallisationstropfen, die im Röntgenstrahl untersucht wurden, zeigten keine sichtbare Modifikation des Asn 115. Es ist zwar möglich, dass die Flexibilität in der Schleife und zusätzlich der pH-Wert die Bildung eines Isoaspartat-Restes begünstigen, diese jedoch nicht alleine die Faktoren sein

können. Tatsache ist, dass es sich um einen nicht ungewöhnlichen, jedoch oft nicht sichtbaren Alterungsprozess von Proteinen handelt.

3.5 Ausblick

Obwohl röntgenkristallografische Daten dynamische Informationen enthalten, können thermodynamische Parameter nicht aus diesen Messungen erhalten werden.

Mit genaueren Methoden, wie z. B. verfeinerten NMR-Methoden (Loh *et al.*, 2001; Mäler *et al.*, 2000) oder ITC (Isothermale Titrationskalorimetrie, Wiseman *et al.*, 1989) ist es heute möglich, die thermodynamischen Effekte von Protein-Ligand-Assoziationen, die in gelöster Form vorliegen, zu beleuchten. Wie bei anderen chemischen Reaktionen gibt es bei der Assoziation von Proteinen und ihrer Liganden eine Änderung der Gibbschen freien Standardenergie (ΔG^0), die sich aus der Änderung der Standardenthalpie ΔH^0 und der Änderung der Standardentropie ΔS^0 zusammensetzt ($\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \Delta S^0$). Hierbei kann vereinfacht die Enthalpie als strukturelle Komponente der Assoziation und die Entropie als dynamische Komponente der Assoziation angesehen werden. Diese Daten aus kernmagnetischen Resonanz-Spektroskopie-Studien (NMR) können verwendet werden, um Röntgenkristalldaten wertvoll zu ergänzen (Zartler *et al.*, 2005).

Die ITC ist eine Methode, die es ermöglicht ΔG , ΔH und ΔS für Biomolekülkomplexe in wässriger Lösung zu bestimmen. Dabei werden sämtliche thermodynamischen Eigenschaften der Bindungen aller Reaktionspartner (Protein, Ligand, Lösungsmittel) sowie ihre Solvatationseffekte ermittelt. Durch den Vergleich kann z. B. aufgeklärt werden, ob eine Protein-Ligand-Wechselwirkung enthalpisch oder entropisch getrieben ist (Homans, 2005).

NMR-Relaxationsmessungen verschiedener Modellproteine, wie z. B. des Drosophila-Drk-Proteins (Yang *et al.*, 1989) oder des Hefe-Transkriptionsfaktors GCN4 (Bracken *et al.*, 1999) wurden bereits etabliert, um die treibenden Kräfte von Konformationsänderungen oder Transitionen zu untersuchen. Diese Technik ermöglicht die Quantifizierung der Bewegungen in biologischen Makromolekülen im Mikro- bis Millisekundenbereich (Palmer *et al.*, 2001). Bisher kann man die NMR-Ergebnisse immer nur auf ein System beziehen. Für ein komplettes Verständnis der Kräfte, die bei Protein-Ligand-Assoziationen wirken, sind parallele Bindungsenthalpiestudien erforderlich.

Das Phänomen der Proteinflexibilität im vorliegenden Trypsin-Faktor Xa-Modellsystem lässt noch viele Frage offen, z.B. wie ausgeprägt die Flexibilität ist oder wie die Flexibilitäten der verschiedenen Varianten relativ zu einander stehen. Die Anwendung der oben genannten Untersuchungsmethoden könnte diese Fragestellung beleuchten. Die schon erwähnte NMR-Spektroskopie kann Informationen über die Dynamik von Proteinen liefern. So wäre es interessant, an isotoopenmarkierten Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten die Wechselwirkungen zu den verschiedenen Inhibitoren zu untersuchen.

Mit ITC, bei der die bereits verwendeten Inhibitoren in kleinen Mengen zu den Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten titriert werden, ließe sich die Enthalpie direkt messen und Aussagen über die Bindungsaffinitäten könnten getroffen werden. Für diese Messungen benötigt man allerdings relativ große Mengen an aufwändig synthetisiertem Protein (mg bis g). Um Aussagen über die Struktur und Stabilität der Varianten zu machen, könnten weiterhin DSC-Untersuchungen (Differential Scanningkalorimetrie) bei den Trypsin-Varianten durchgeführt werden. Eine zusätzliche Schwierigkeit der Varianten des Faktor Xa-Trypsin-Systems ist bei fast allen Untersuchungsmethoden der Fall: Es handelt sich um aktive Proteinase. Bei den jeweiligen Versuchsbedingungen herrschen optimale Bedingungen, wodurch die Stabilität der Proteinase durch den Selbstverdau gefährdet ist. Daher sind alternative Strategien notwendig.

4 Ergebnisse und Diskussion: Modifizierung der Enzymspezifität

4.1 Design einer Restriktions-Proteinase

Um effektiv die Spezifität der Serinproteinase Trypsin zu modulieren, sollte im Bereich der Bindetasche ein Austausch durchgeführt werden. Dazu wurde auf den bereits verwendeten pET3a-Vektor, der die Sequenz des nativen Rindertrypsinogens trägt, zurückgegriffen. Hier wurde die so genannte ‚99er‘-Schleife der Spezifitätsbindetasche für Mutationen ausgewählt, weil dieser Bereich bei der verwandten Serinproteinase Enterokinase entscheidend zur Spezifität der Proteinase beiträgt. Hier besitzt die Enterokinase an der Oberfläche vier basische Reste in Folge, die mit aziden Resten ihres natürlichen Substrates, dem Trypsinogen, über ionische Wechselwirkungen interagieren (**Abbildung 22**). Die neue Trypsin-Variante sollte dadurch enterokinaseähnliche Eigenschaften besitzen, die zur Spaltung von Fusionsproteinen mit Enterokinase-Spaltstelle genutzt werden können. Um diese so genannte enterokinaseähnliche Trypsin-Variante bei ihrer Verwendung aus dem Prozess wieder abreichern zu können, wurde in die Proteinase zusätzlich ein C-terminaler, nicht abspaltbarer Histidin-Tag eingeführt.

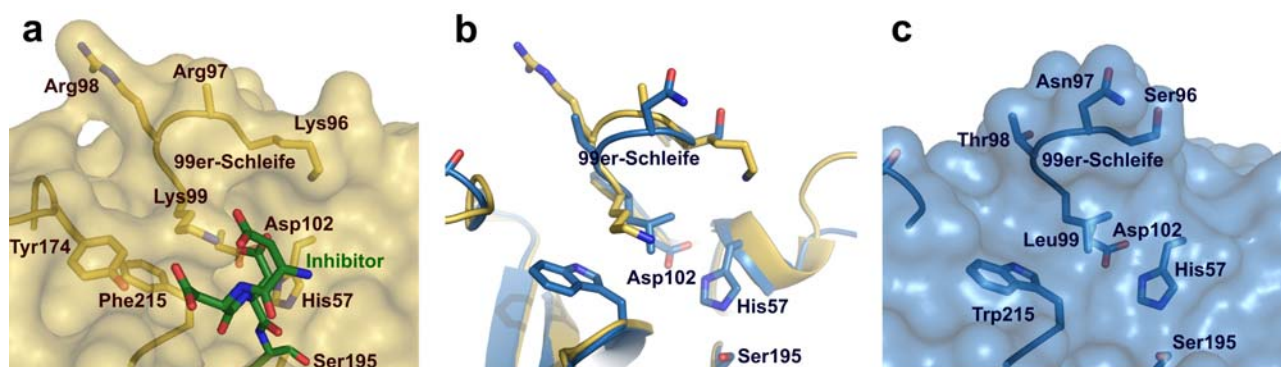


Abbildung 22 Vergleich der ‚99er‘-Schleife bei Enterokinase und Rindertrypsin

a: Die ‚99er‘-Schleife ist Teil der S3/S4-Bindetasche und grenzt direkt an die katalytischen Triade. Bei der Enterokinase verleihen die Seitenketten der Reste 96 bis 99 der Oberfläche einen basischen Charakter, der für die Wechselwirkung mit der Prosequenz ihres Substrates essentiell ist. Hier sind die Aspartat-Reste des Substrats Val-Alsp-Asp-Asp-Asp-Lys-Chloromethan in der Bindetasche dargestellt [1EKB]. **b:** In der Überlagerung der Strukturen der Enterokinase und des Rindertrypsins [1MTS] erkennt man die Übereinstimmung der Hauptkette der ‚99er‘-Schleife. Lediglich die Seitenketten der Reste auf der Oberfläche sind durch Torsionsbewegungen unterschiedlich. **c:** Die Reste der ‚99er‘-Schleife des Rindertrypsins: Ser 96, Asn 97, Thr 98 und Leu 99 [1MTS].

4.2 Strategie und Design

Als zu verändernde Sequenzen im Rindertrypsin wurden in der ‚99er‘-Schleife die vier Reste in den Positionen 96, 97, 98 und 99 ausgewählt und durch die basischen Reste

Lys 96-Arg 97-Arg 98-Lys 99 ersetzt. Zusätzlich wurde am C-terminalen Ende ein nicht abspaltbarer Histidin-Tag aus sechs Histidin-Resten ohne *Spacer* angefügt.

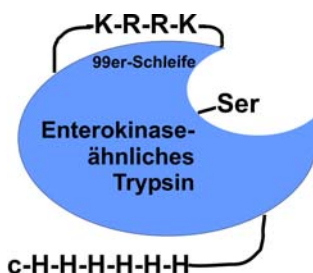


Abbildung 23 Strategie des Enterokinase-ähnlichen Trypsins

In der so genannten ‚99er‘-Schleife wurden die Reste 97 bis 99 durch die basischen Reste Lys-Arg-Arg-Lys ersetzt. Zusätzlich wurde ein nicht abspaltbarer, C-terminaler Histidin-Tag angefügt.

Für die Umsetzung wurde der vorhandene pET3a-Vektor mit der Sequenz des Rindertrypsinogens verwendet. Im ersten Schritt wurde zunächst durch ortsgerichtete Mutagenese in der ersten PCR-Reaktionsfolge der Histidin-Tag eingeführt (**Abbildung 23**). Nach einer Kontrollsequenzierung wurde in einem zweiten Schritt das generierte Plasmid im Bereich der ‚99er‘-Schleife mutiert. Das enterokinaseähnliche Trypsin wurde nach den gleichen Protokollen wie die Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten hergestellt und die Überexpression und Reinigung des Proteins analog durchgeführt. Die aktive Trypsin-Variante wurde an einer SBTI-Agarosesäule und die inaktive Trypsinogen-Variante an einer Ni-NTA-Sepharose-Säule chromatografisch aufgereinigt. Dabei zeigte sich, dass das als Zymogen exprimierte und rückgefaltete enterokinaseähnliche Trypsinogen im Tris gepufferten Milieu bei einem pH-Wert von 6.5 bereits Aktivität zeigte, die sich durch Zugabe von kommerzieller Enterokinase nicht steigern ließ. Zur Verhinderung dieser Selbstaktivierung wurde bei der Herstellung für die Trypsinogen-Variante daher der pH-Wert der Lösungen immer im sauren (< 4) Bereich gehalten.

4.3 Herstellung und Charakterisierung des enterokinaseähnlichen Trypsins

Die enterokinaseähnliche Trypsin-Variante ließ sich chromatografisch aufreinigen (Ausbeute: 3.1 mg aktives Protein/l Kultur, **Tabelle 10**). Sie konnte mit dem Inhibitor **(2)** kokristallisiert werden (**Abbildung 24**) werden (30 % PEG 8000; 0.1 M Imidazol; 0.2 M Ammoniumsulfat; pH 7.0) und die Struktur bis zu einer Auflösung von 2.1 Å bestimmt werden (**Tabelle 11**, **Tabelle 12**). In der Struktur sind die Seitenketten der ‚99er‘-Schleife nicht vollständig durch die Elektronendichte definiert. Dennoch kann man erkennen, dass es sich nicht um die Ausgangssequenz, sondern um die gezielt mutierten Reste handelt (**Abbildung 25a**). Ebenso ist am C-terminalen Ende der Sequenz die Elektronendichte von nur einem Histidin erkennbar (**Abbildung 25b**), da sich diese Sequenz, wie auch die ‚99er‘-Schleife, an der Oberfläche des Proteins befindet und beweglich ist. Um die Vollständigkeit der Mutationen in der ‚99er‘-Schleife und des Histidin-Tags zu überprüfen,

wurde die Variante massenspektrometrisch untersucht. Die errechnete molare Masse des enterokinaseähnlichen Trypsins von 24 269 Da wurde durch die ermittelten $24\,268 \pm 1$ Da bestätigt und sichert somit die Richtigkeit der Mutationen.

Tabelle 10 Ausbeute des enterokinaseähnlichen Trypsins

Variante	absolute Menge an Zellmasse	g Ausbeute an Zellmasse/ l Kultur	absolute Menge <i>inclusion bodies</i>	mg isolierte <i>inclusion bodies</i> /g Zellen	absolute Menge aktives Protein ¹	µg aktives Protein/ mg <i>inclusion bodies</i>	mg aktives Protein /l Kultur
enterokinaseähnliches Trypsin	28.1 g/6l	4.7 g/l	520 mg	18.5 mg/g	28 mg	140 µg/mg IB	3.1 mg/l

¹Für die Rückfaltung wurde nicht immer die gesamte gewonnene Menge an *inclusion bodies* eingesetzt



Abbildung 24 Proteinkristall des enterokinaseähnlichen Trypsins. Obwohl sich sofort nach dem Ansetzen der Kristallisationen sehr viel Präzipitat bildete, wuchsen innerhalb von 10 Tagen orthorhombische Kristalle heran, die vermessen werden konnten.

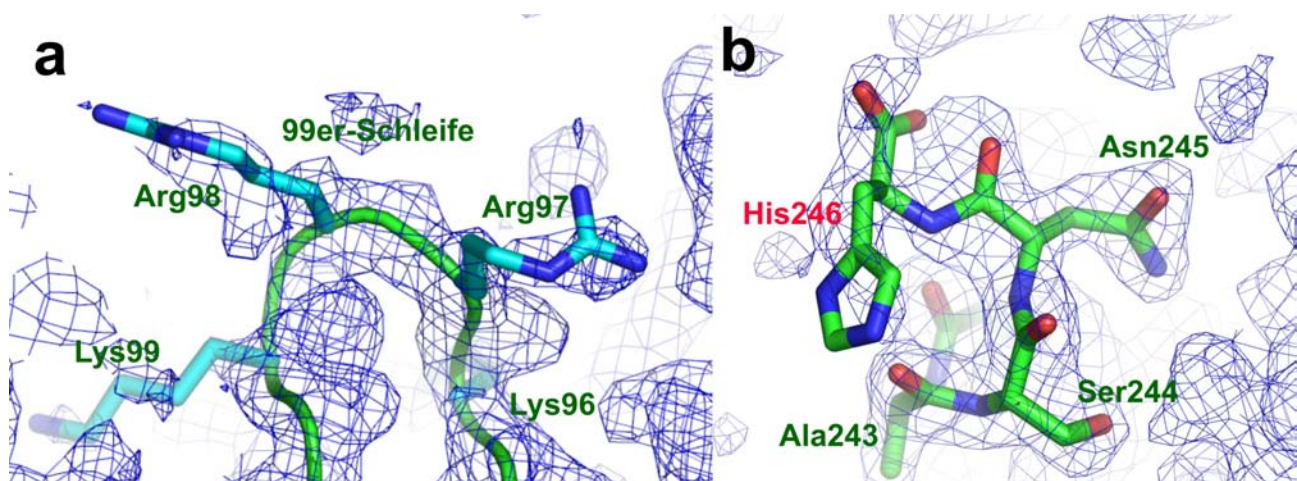


Abbildung 25 ,99er'-Schleife und Histidin-Tag des enterokinaseähnlichen Trypsins. Die Darstellung der Elektronendichte (blaues Netz) und das angepasste Modell des enterokinaseähnlichen Trypsins. **a:** zeigt den Bereich der ,99er'-Schleife. Durch Seitenkettentorsionen sind die distalen Reste nicht vollständig definiert. Dennoch sind die Mutationen zu erkennen. **b:** Der C-Terminus mit Asn 245 und einem sichtbaren Histidin-Rest.

Auch für das enterokinaseähnliche Trypsin wurde mit der Arbeitsgruppe von Jörg Stürzebecher in Jena zusammengearbeitet. Es konnten K_m - und k_{cat} -Werte bestimmt werden, die allerdings unter den gegebenen Bedingungen nicht zuverlässige Ergebnisse lieferten. Die Methode (Stürzebecher *et al.*, 1997) ist bei Faktor Xa und Trypsin mit spezifischen Substraten gut anwendbar. Das enterokinaseähnliche Trypsin ist vermutlich durch die Mutationen bereits so stark abgewandelt, dass es sich für die oben erwähnten K_m - und k_{cat} -Bestimmungen nicht mehr eignet.

Tabelle 11 Kristallisationsbedingungen und Datenaufnahme-Statistik: enterokinaseähnliches Trypsin

Struktur ^a	Kristallisations- bedingungen ^b	Ligand ^c	Kristall- form	Raum- gruppe	Zellkonstanten			gesamte/ einzelne Reflexe	R_{symm}^d (%) gesamt/ höchste Auflösung	Auflösu- ng (Å) gesamt/ höchste Auflösung
					a α	b β	c γ			
enterokinaseähnliches Trypsin.K1	30% PEG 8000; 0.1M Imi ^e ; 0.2M AmS ^e ; pH7.0	1	B	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	61.0 90	64.0 90	70.0 90	15668/ 4768	6.8, 11.3	50.0-2.1, 3.29-2.1
^a Die Struktur wird wie folgt bezeichnet: {Variante} {Kristallform} {Inhibitor}.										
^b Der Kristall wurde bei Raumtemperatur erhalten.										
^c Siehe Abbildung Abbildung 13 Strukturformeln der Inhibitoren										
^d $R_{sym} = \sum(I - \langle I \rangle) / \sum(I)$										
^e Imidazol, Ammoniumsulfat										

Tabelle 12 Verfeinerungsstatistik: enterokinaseähnliches Trypsin

Struktur	Anzahl der nicht-Wasserstoffatome/ asymmetrische Einheit				Mittlere quadratische Abweichung		R_{work} (%) gesamt/ höchste Auflösung	R_{free} (%) gesamt/ höchste Auflösung
	Protein	Ionen	Solvens	Inhibitor	Bindung (Å)	Winkel (°)		
enterokinaseähnliches Trypsin.K1	1650	1 Ca ²⁺ ; 2 SO ₄ ²⁻	153	9	0.0554	1.315	21.4	24.9

4.4 Qualitativer Nachweis der Aktivität des enterokinaseähnlichen Trypsins

4.4.1 Selbstspaltung

Um die Eigenschaften und die Qualität des enterokinaseähnlichen Trypsins zu untersuchen, wurde seine Selbstzersetzung bzw. die Aktivität im Vergleich mit kommerzieller Enterokinase bzw. kommerziellem Rindertrypsin untersucht. Als Substrate dienten enterokinaseähnliches Trypsinogen und rekombinantes Trypsinogen. Für diesen Versuch wurde rekombinantes Trypsinogen verwendet, damit ein direkter Vergleich möglich war. Dieses rekombinante Trypsinogen wurde im Labor nach den gleichen Protokollen, wie in den Kapitel 2.5.1 bis 2.5.3 und 2.5.5.2 beschrieben, hergestellt.

Zunächst wurde beobachtet, wie sich das enterokinaseähnliche Trypsin unter optimalen Reaktionsbedingungen (Reaktionspuffer-Lösung: 50 mM Tris, 154 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , pH 8.0) bei 37° C ohne Substrat verhält. Dazu wurde in einem Versuch die aktive Variante (enterokinaseähnliches Trypsin), in einem Vergleichsversuch die inaktive, zymogene Vorstufe (enterokinaseähnliches Trypsinogen) und in einem dritten Versuch rekombinantes Trypsinogen in Reaktionspuffer-Lösung bei 37° C unter leichtem Schwenken inkubiert (**Abbildung 26a, c und f**). Über eine Zeit von mindestens 6 Stunden wurden 10 Proben, nach ca. einem Tag zwei weitere Proben gezogen und anschließend per SDS-PAGE analysiert. **Abbildung 26a** zeigt, dass sich das enterokinaseähnliche Trypsin über den untersuchten Zeitraum hin nicht verändert, auch nicht bei einer Inkubation über Nacht (19 h und 21 h). Dagegen beginnt die Spaltung des enterokinaseähnlichen Trypsinogens sofort, ist innerhalb von 2 h vollständig und baut sich weiterhin ab (**Abbildung 26c**). Im Vergleich dazu wird das rekombinante Trypsinogen erst nach ca. 50-60 min gespalten und ist innerhalb von 6 h vollständig abgebaut (**Abbildung 26f**).

Unter den gegebenen Versuchsbedingungen ist auffällig, dass sowohl beim rekombinanten Trypsinogen als auch beim enterokinaseähnlichen Trypsinogen eine Selbstspaltung nach einiger Zeit einsetzt, wobei die des enterokinaseähnlichen Trypsins um den Faktor 3 schneller ist. Dagegen spaltet sich das enterokinaseähnliche Trypsin während des Versuchs nicht selbst. Dies ist bemerkenswert, aber bisher nicht erklärbar.

Das enterokinaseähnliche Trypsin ist dem Versuch zufolge in der Lage, die Spaltung von enterokinaseähnlichem Trypsinogen und rekombinanten Trypsinogen rasch durchzuführen. Mit der kommerziellen Enterokinase funktioniert diese Spaltung bei beiden Substraten immer noch um den Faktor 2 bis 3 schneller.

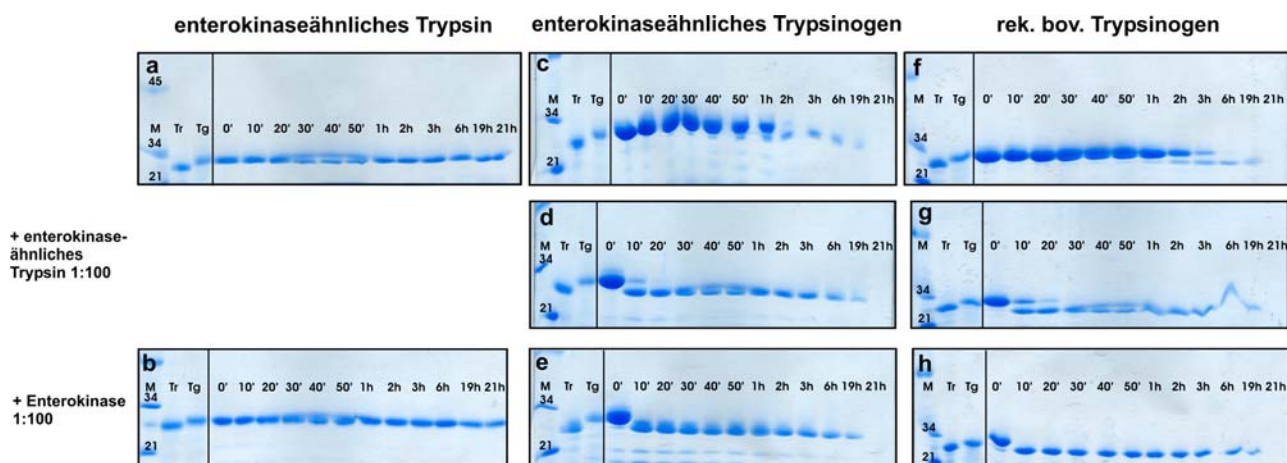


Abbildung 26 Selbstspaltung des enterokinaseähnlichen Trypsins im Vergleich

Auf jedes SDS-PAGE-Gel wurde ein Molekulargewichtsstandard (M, mit Größenangaben in kDa), als Referenzen kommerzielles Trypsin (Tr, ca. 24 kDa) und kommerzielles Trypsinogen (Tg, ca. 25 kDa) aufgetragen. **a, b**: enterokinaseähnliches Trypsin ist ohne und mit Zusatz von kommerzieller Enterokinase über den Inkubationszeitraum unverändert. **c, f**: enterokinaseähnliches Trypsinogen und rekombinantes Rindertrypsinogen sind beide in der Lage nach einigen Stunden Inkubationszeit, sich selbst zu aktivieren. Unterhalb der starken Bande des Proenzym erscheint im Verlauf der Inkubation eine zweite Bande, die der gekürzten und aktiven Proteinase entspricht. Diese Bande wird nach 3 h bis 6 h ebenfalls schwächer, was auf den Selbstverdau hindeutet. **d, e**: Die Aktivierung des enterokinaseähnlichen Trypsinogens (der Vorstufe

des enterokinaseähnlichen Trypsins) geschieht nach Zusatz von enterokinaseähnlichem Trypsin bzw. kommerzieller Enterokinase etwa gleich schnell. **g, h**: Das rekombinante Trypsinogen wird durch die kommerzielle Enterokinase schon nach 10 min vollständig aktiviert, während auffällt, dass die Aktivierung durch das enterokinaseähnliche Trypsin länger, nämlich ca. 30 min dauert. Der zusätzliche His-Tag am enterokinaseähnlichen Trypsin könnte möglicherweise einen Einfluss haben.

In weiteren Versuchen wurden unter gleichen Bedingungen enterokinaseähnliches Trypsinogen, rekombinantes Trypsinogen und enterokinaseähnliches Trypsin mit jeweils einem Hundertstel enterokinaseähnlichem Trypsin bzw. kommerzieller Enterokinase inkubiert und analysiert (**Abbildung 26d, e, g, h und b**). Die Vorstufen der Enzyme lassen sich rasch durch das enterokinaseähnliche Trypsin spalten. Das enterokinaseähnliche Trypsinogen ist bereits nach 20 min vollständig zum aktiven Enzym umgewandelt (**Abbildung 26d**), das rekombinante Trypsinogen nach 30 min (**Abbildung 26g**). Etwa mit gleicher Geschwindigkeit spaltet die kommerzielle Enterokinase das enterokinaseähnliche Trypsinogen (**Abbildung 26e**). Das Rindertrypsinogen lässt sich jedoch durch die kommerzielle Enterokinase, welche der natürliche Aktivator für das Zymogen ist, schneller spalten. Es ist schon bei der 0 min Probe fast vollständig gespalten (**Abbildung 26h**). Dies ist im Gegensatz zu **Abbildung 26g** bemerkenswert. Eine Erklärung könnte sein, dass der zusätzliche His-Tag am enterokinaseähnlichen Trypsin einen Einfluss hat. Die Zugabe kommerzieller Enterokinase zum enterokinaseähnlichen Trypsin bewirkt keine Veränderung (**Abbildung 26b**).

4.4.2 Substratspaltung

In den nächsten Versuchen mit dem enterokinaseähnlichen Trypsin wurden vier verschiedene Fusionsproteine, die eine Enterokinase-Spaltstelle mit der Erkennungssequenz –D-D-D-D-K- besitzen, getestet.

Die folgenden Fusionsproteine, die freundlicherweise aus den Arbeitsgruppen von Dr. Hauke Lilie und Prof. Rainer Rudolph zur Verfügung gestellt wurden, wurden untersucht:

- A) Grün fluoreszierendes Protein mit einem abspaltbaren, N-terminalen sechsfachen Histidin-Tag (6-His-DDDDK + eGFP; 8 kDa + 27 kDa)
- B) Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und einem 84 Aminosäuren langen Teil des Parathormons und eGFP (GST-DDDDK + PTH 1-84-eGFP; 31 kDa + 38 kDa)
- C) Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und einem 34 Aminosäuren langen Fragment des Parathormons (GST-DDDDK + PTH-1-34; 31 kDa + 4 kDa)
- D) Fusionsprotein aus einem N-terminalen sechsfachen Histidin-Tag am *Glucagon-like-peptide-1* und eGFP (6-His- GLP1-DDDDK + eGFP; 3.5 kDa + 31.5 kDa)

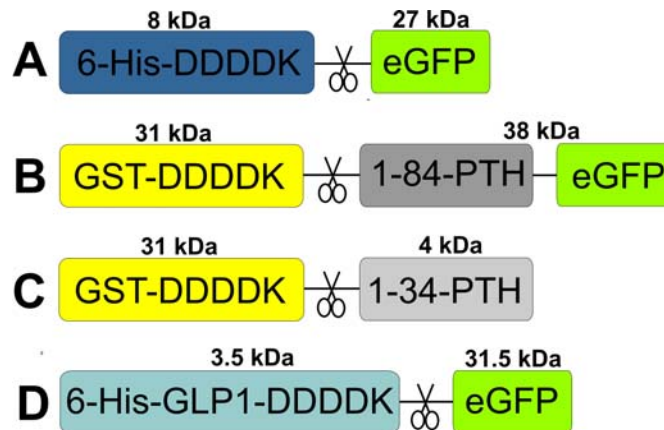


Abbildung 27 Schematische Darstellung der untersuchten Fusionsproteine
Alle vier Fusionsproteine besitzen zwischen den Fusionspartnern die Erkennungssequenz -DDDDK-, nach der die Enterokinase die Aminosäurekette spaltet.

Alle oben aufgeführten Fusionsproteine wurden unter denselben Bedingungen wie die vorangegangenen Versuche mit enterokinaseähnlichem Trypsin, boviner Enterokinase und Rindertrypsin inkubiert. Von den Fusionsproteinen C und D stand nur wenig Material zur Verfügung, so dass diese nur mit enterokinaseähnlichem Trypsin und Kälberenterokinase, nicht jedoch mit kommerziellem Rindertrypsin versetzt werden konnten.

Fusionsprotein A)

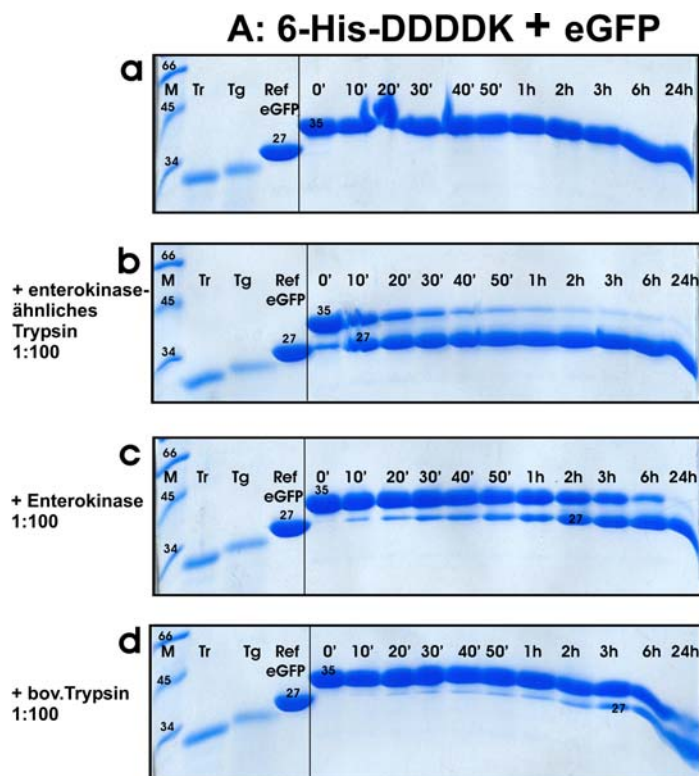


Abbildung 28 SDS-PAGE von Fusionsprotein A

Auf allen Gelen ist ein Molekulargewichtsstandard (M, mit Größenangaben in kDa), als Referenzen kommerzielles Trypsin (Tr), kommerzielles Trypsinogen (Tg) und natives eGFP (Ref eGFP) aufgetragen. **a:** Fusionsprotein A ist über den Inkubationszeitraum unverändert. **b:** Enterokinaseähnliches Trypsin spaltet den Histidin-Tag von eGFP nach wenigen Stunden vollständig ab, während es mit der kommerziellen Enterokinase 24 h dauert (**c**). **d:** Rindertrypsin spaltet hier das eGFP noch langsamer.

Das SDS-PAGE-Gel (**Abbildung 28a**) zeigt, dass das untersuchte eGFP mit N-terminalem Histidin-Tag stabil ist und über den Untersuchungszeitraum im Reaktions-Puffer unverändert bleibt. Durch Zugabe von enterokinaseähnlichem Trypsin (**Abbildung 28b**) setzt die Spaltung sofort ein und ist nach 2 bis 3 h Inkubation vollständig. Die Enterokinase spaltet dagegen den Histidin-Tag viel langsamer ab, die Reaktion ist erst nach 24 h beendet (**Abbildung 28c**). Kommerzielles Rindertrypsin (**Abbildung 28d**) ist ebenfalls in der Lage den Histidin-Tag vom Fusionsprotein abzuspalten. Dies geschieht aber langsam und nicht bei der gesamten, eingesetzten eGFP-Menge in der beobachteten Zeit.

Fusionsprotein B)

Beim GST-PTH 1-84-eGFP-Fusionsprotein zeigt sich ein ähnlicher Effekt wie bei Fusionsprotein A: Die kommerzielle Enterokinase (**Abbildung 29c**) spaltet das 69 kDa große Konstrukt nur sehr langsam und nicht vollständig innerhalb von 24 h. Dagegen arbeiten das enterokinaseähnliche Trypsin und das kommerzielle Rindertrypsin etwa gleich schnell: schon nach 10 min ist die Spaltung in das 38 kDa große PTH 1-84-eGFP- und in das 31 kDa große GST-Fragment vollständig (**Abbildung 29b** und **Abbildung 29d**).

B: GST-DDDDK + 1-84-PTH-eGFP

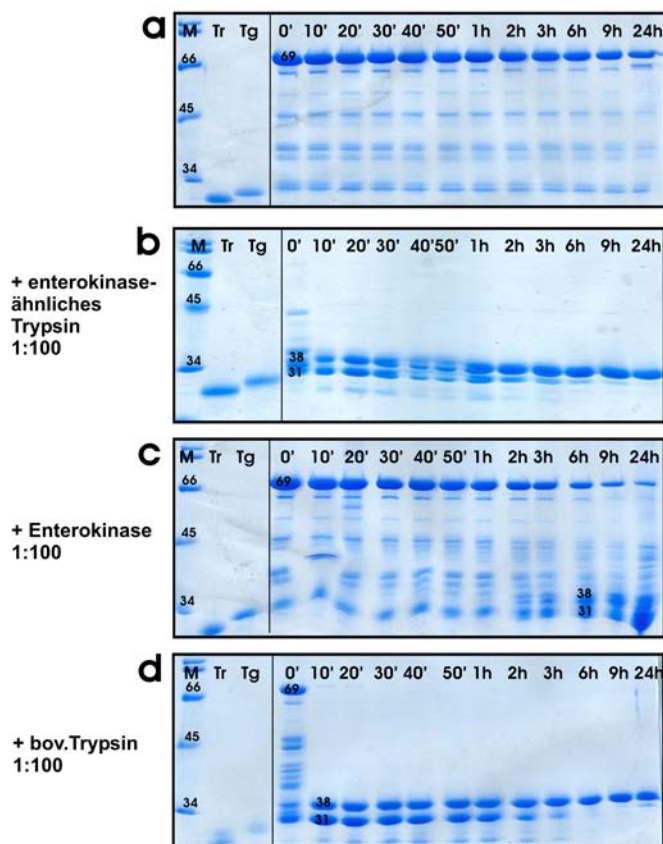


Abbildung 29 SDS-PAGE von Fusionsprotein B

Auf die Gele sind die gleichen Referenzproteine wie bei Abbildung 26 aufgetragen. **a:** Bei alleiniger Inkubation bleibt das Fusionsprotein (69 kDa) stabil. Die weiteren Banden sind Verunreinigungen des Fusionsproteins. **b, d:** Die Spaltung in das 38 kDa große PTH-eGFP und in das 31 kDa große GST durch enterokinaseähnliches Trypsin und Rindertrypsin gelingt bereits nach 10 min, während die Spaltung durch Enterokinase innerhalb von 24 h nicht vollständig ist (**c**).

Weiterhin kann man beobachten, dass auf den Gelen **Abbildung 29b** und **Abbildung 29d** die Bande des GST-Fragments (31 kDa) ab einer Inkubationszeit von 2-3 h schwächer wird und nach 6-8 h nicht mehr sichtbar ist. Offensichtlich ist das GST-Fragment von den Proteinasen abgebaut worden.

Auffällig hier ist, dass die Spaltung von Fusionsprotein B mit enterokinaseähnlichem Trypsin und mit kommerziellem Rindertrypsin praktisch die gleichen Ergebnisse liefert. Es ist qualitativ kein Unterschied zu erkennen, denn beide Proteinasen spalten mit etwa gleicher Geschwindigkeit das Substrat. Aus Sicht des Fusionsproteins B kann man sagen, dass das enterokinaseähnliche Trypsin und das kommerzielle Rindertrypsin gleichwertig sind. Im Hinblick auf Fusionsprotein A verhalten sich das enterokinaseähnliche Trypsin und das kommerzielle Rindertrypsin sehr unterschiedlich. Dies könnte sich im unterschiedlichen Aufbau der Fusionsproteine A und B begründen: Fusionsprotein B ist mehr als doppelt so groß und dadurch im Aufbau komplexer. Demzufolge ist möglicherweise die Spezifität der Spaltstelle weniger stark ausgeprägt.

Fusionsprotein C)

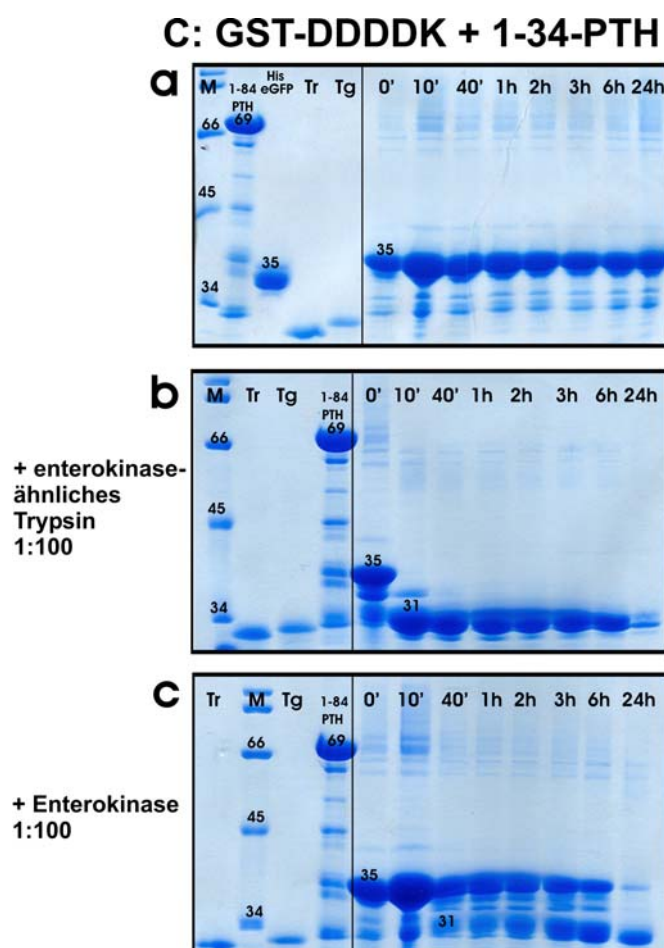


Abbildung 30 SDS-PAGE von Fusionsprotein C

Auf die Gele sind die gleichen Referenzproteine wie bei Abbildung 26 aufgetragen. Zusätzlich sind Fusionsprotein A (His-eGFP) und B (GST-PTH-1-84-eGFP) als Referenz aufgetragen. Gel **a** zeigt, dass das Fusionsprotein alleine unter den Reaktionsbedingungen stabil ist. Auf Gel **b** ist zu sehen, dass das enterokinaseähnliche Trypsin das Fusionsprotein C rasch spaltet (10 min) und das entstandene, freie GST innerhalb 24 h weiter abbaut, während bei **c** die kommerzielle Enterokinase die vollständige Spaltung erst nach 24 h bewirkt.

Das GST-PTH-1-34-Fusionsprotein besteht aus einem kürzeren Fragment des PTH-Rezeptors, welches von GST abspaltbar ist. Dieses PTH-Rezeptorfragment ist nur ca. 4 kDa groß, so dass es nach der Abspaltung auf den Gelen als Bande (**Abbildung 30**) selbst nicht sichtbar ist, sondern nur der größere, aber gekürzte Fusionspartner GST (31 kDa). Bei der Inkubation dieses Fusionsproteins mit dem enterokinaseähnlichen Trypsin und der kommerziellen Enterokinase kann man beobachten, dass das enterokinaseähnliche Trypsin (**Abbildung 30b**) innerhalb von 10 Minuten das Fusionsprotein vollständig spaltet, während dieselbe Reaktion mit kommerzieller Enterokinase 24 h dauert (**Abbildung 30c**).

Auch hier ist wie bei Konstrukt B bei der längeren Inkubation von einem Tag der weitere Abbau des Fusionspartners GST durch das enterokinaseähnliche Trypsin zu beobachten (**Abbildung 30b** und **Abbildung 29b**).

Fusionsprotein D)

In diesem Versuch wurde das mit Histidin-Tag markierte GLP 1-Rezeptorfragment vom eGFP abgespalten. Wie beim Fusionsprotein C) kann man die Abspaltung nur anhand des entstandenen eGFP-Fragments (31.5 kDa) beobachten. Auch hier arbeitet das enterokinaseähnliche Trypsin (**Abbildung 31b**) deutlich schneller als die kommerzielle Enterokinase (**Abbildung 31c**) und ist dadurch effektiver.

D: 6His-GLP1-DDDDK + eGFP

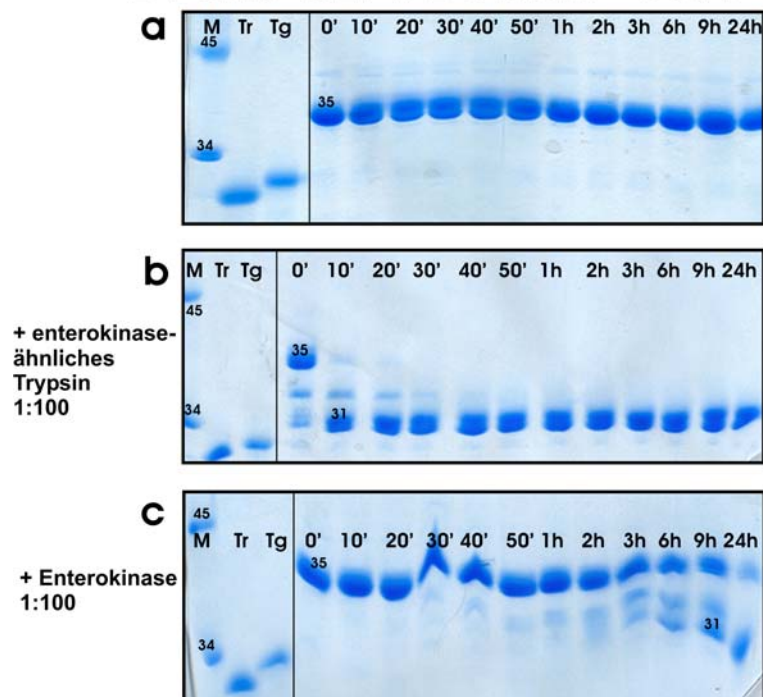


Abbildung 31 SDS-PAGE von Fusionsprotein D

Auf die Gele sind die gleichen Referenzproteine wie bei **Abbildung 26** aufgetragen. Wie bei Fusionsprotein C ist das Fusionsprotein D in der Lösung stabil (**a**) und lässt sich durch das enterokinaseähnliche Trypsin sehr schnell (10 min) spalten, wobei die Reaktion mit kommerzieller Enterokinase 24 h dauert (**c**). Auf Gel **b** (Bande nach 24 h) ist zu erkennen, dass eGFP gegen das enterokinaseähnliche Trypsin stabil ist.

4.5 Vorbereitende Versuche für die praktische Anwendung des enterokinaseähnlichen Trypsins

Mit dem enterokinaseähnlichen Trypsin wurde in einigen Vorversuchen geprüft, ob sich die Erkenntnisse, die sich aus den qualitativen Versuchen ergaben, technisch umsetzen ließen. Als Testprotein wurde das Fusionsprotein eGFP mit sechsfachem Histidin-Tag (His-eGFP) gewählt, das bereits in den vorgestellten Versuchen untersucht wurde (Fusionsprotein A).

4.5.1 Spaltung des Fusionsproteins im Batch-Verfahren

In diesem Versuch sollte Fusionsprotein A mit dem enterokinaseähnlichen Trypsin in einem Ansatz inkubiert werden. Aus dem Ansatz sollte in einem Abtrennvorgang mit losem Ni-NTA-Sepharose-Säulenmaterial sowohl der abgespaltene Histidin-Tag des eGFP als auch das enterokinaseähnliche Trypsin (via C-terminalem Histidin-Tag) abgefangen und vom freien eGFP abgetrennt werden.

Zunächst wurde das Fusionsprotein A in Reaktionspuffer (50 mM Tris, 154 mM NaCl, 10 mM CaCl_2 , pH 8.0) bei 37°C mit dem enterokinaseähnlichen Trypsin im Verhältnis 50:1 inkubiert und über einen Zeitraum von 60 min alle 10 min Proben gezogen (**Abbildung 32a, Inkubation**). Gemäß den vorangegangenen Untersuchungen wurde angenommen, dass die Reaktion bereits nach 10-20 min abgeschlossen war. Danach wurde eine Suspension von 1.5 ml Ni-NTA-Sepharose hinzugegeben und für 30 min inkubiert, wodurch die Histidin-Reste des Proteins mit den Ni-Ionen des Säulenmaterials eine Komplexbindung ausbilden können. Dies wurde weiterhin beprobt (**Abbildung 32a, Bindung**).

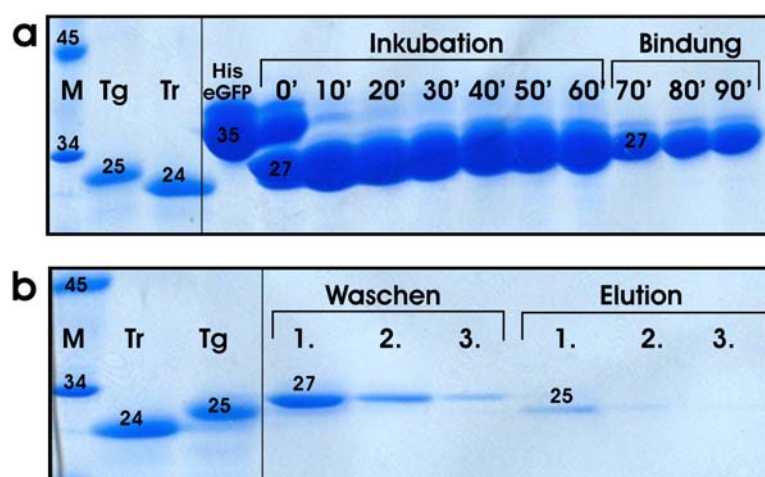


Abbildung 32 eGFP-Spaltung und Abtrennung im Batchverfahren

Auf die Gele sind die gleichen Referenzproteine wie bei Abbildung 26 aufgetragen. **a:** Der Histidin-Tag des eGFP ist schon nach 20 min vollständig abgespalten (Inkubation). Im Überstand des Reaktionsansatzes befindet sich nur das freie eGFP (Bindung). **b:** Durch das dreimalige Waschen der Ni-NTA-Sepharose wird das ungebundene eGFP entfernt. Bei der anschließenden Elution vom Säulenmaterial wird das enterokinaseähnliche Trypsin vom Säulenmaterial gelöst. Da es in fünfzigfacher Verdünnung eingesetzt wurde, ist die Bande auf dem Gel nur schwach zu erkennen.

In drei folgenden Waschschritten mit Puffer III (s. Kap. 2.5.5.2) wurde das gespaltene Fusionsprotein durch vorsichtiges Schwenken und anschließendes Zentrifugieren unter milden Bedingungen (max. 3000 g) aus dem Ansatz abgetrennt (**Abbildung 32b, Waschen**). Danach konnte das enterokinaseähnliche Trypsin von der Ni-NTA-Sepharose durch drei weitere Waschschrritte mit Puffer IV (s. Kapitel 2.5.5.2) eluiert werden (**Abbildung 32b, Elution**). Der Ansatz im Batch erbrachte das gewünschte Ergebnis. Die Durchführung gelang innerhalb weniger Stunden ohne großen apparativen Aufwand.

4.5.2 Immobilisierung des enterokinaseähnlichen Trypsins, Spaltung an gepackter Säule

Es wurde versucht, das enterokinaseähnliche Trypsin an aktiviertes NHS-Sepharose-Säulenmaterial kovalent zu binden, so dass es irreversibel an das Säulenmaterial gebunden ist, aber dennoch aktiv ist. In einer gepackten Säule, die das enterokinaseähnliche Trypsin trägt, könnte dann beim Durchfluss ein Fusionsprotein gespalten werden. Somit könnte einerseits die Kontaktzeit von Fusionsproteinen mit dem Säulenmaterial gesteuert, andererseits der Spaltprozess z.B. in eine Schrittkette eines Herstellungsprozesses implementiert werden.

NHS-Sepharose (N-Hydroxylaminsuccinimid) ist ein Säulenmaterial, welches reaktive NHS-Gruppen an seiner Oberfläche trägt. N-Hydroxylaminsuccinimid ist ein ringförmiger, leicht reaktiver Rest und in der Lage, unter Ringöffnung mit Aminen kovalente Bindungen einzugehen. Bei Proteinen können die Seitenketten von z.B. Lysin-Resten oder N-Termini von Proteinen mit NHS-Gruppen reagieren. Das enterokinaseähnliche Trypsin trägt mehrere Lysine auf seiner Oberfläche. Dagegen ist der N-Terminus beim aktiven Trypsin nicht der Proteinoberfläche zugewandt, sondern in das Innere des Proteins gefaltet.

Für die Durchführung wurde NHS-Sepharose verwendet und die Reaktion gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. 5 ml Säulenmaterial wurden mit 3.7 mg enterokinaseähnlichem Trypsin gekoppelt und in eine XK-16-Säule gepackt.

Nach sorgfältigem Waschen der Säule mit Tris-Puffer (s. 0Kapitel 2.5.9, ohne Ethanol) wurden drei verschiedene Mengen an His-eGFP auf die Säule aufgetragen (100 µg, 500 µg und 1000 µg). 100 µg und 500 µg eluierten bei einer Flussrate von 0.5 ml/min in einem symmetrischen Peak von der Säule. Die Analyse auf SDS-PAGE zeigte zwei Spezies, nämlich ungespaltenes und gespaltenes Fusionsprotein (**Abbildung 33a**) und legt nahe, dass die Reaktion nicht quantitativ verlaufen ist. Bei der großen Auftragsmenge von 1 mg hat der entsprechend größere Peak eine Schulter und verläuft asymmetrisch (*tailing*) (**Abbildung 33b**). Die ersten beiden Fraktionen des Peaks (F1 und F2) weisen nur ungespaltenes Fusionsprotein auf, die Schulter (F3 bis F8) enthält ein Gemisch aus gespaltenem und ungespaltenem Fusionsprotein. Außerdem ist zu erkennen, dass je später das Protein von der Säule eluiert, desto größer ist der Anteil am gespaltenen Fusionsprotein.

Das auf der Sephadrose-Säule immobilisierte enterokinaseähnliche Trypsin ist demnach aktiv und in der Lage, das getestete Fusionsprotein zu spalten. Unabhängig von der aufgetragenen Proteinmenge trat in allen gesammelten Fraktionen noch ungespaltenes Fusionsprotein auf. Möglicherweise war die Kontaktzeit zwischen Fusionsprotein und Proteinase zu gering.

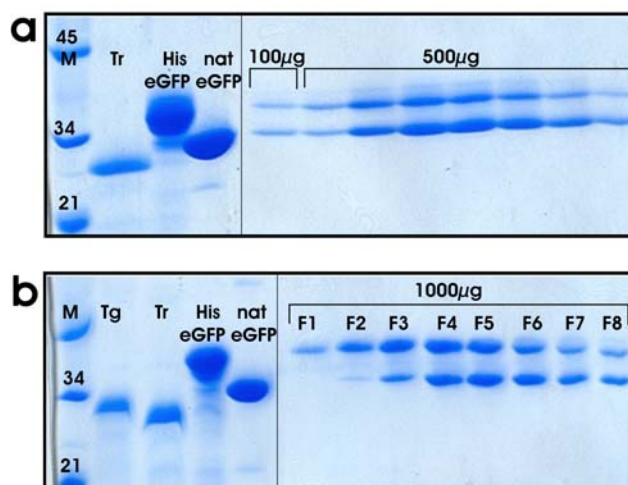


Abbildung 33 eGFP-Spaltung an enterokinaseähnlicher Trypsin-Sepharose

Auf die Gele sind die gleichen Referenzproteine wie bei Abbildung 26 aufgetragen. Zusätzlich sind His-eGFP und natives eGFP als Referenz aufgetragen. **a, b:** Beide Gele zeigen die Fraktionen des Peaks nach Auftragen der unterschiedlichen Volumina an His-eGFP. Alle Fraktionen enthalten in unterschiedlichen Anteilen sowohl gespaltenes als auch ungespaltenes Fusionsprotein. Ausnahme ist die F1-Fraktion, die nur His-eGFP enthält.

4.6 Diskussion: Schlussfolgerungen aus den Versuchen des enterokinaseähnlichen Trypsins

Die getesteten Fusionsproteine lassen sich durch das enterokinaseähnliche Trypsin schnell und effizient abspalten. Das enterokinaseähnliche Trypsin ist aktiv und kann die untersuchten Fusionsproteinkonstrukte schneller spalten als die kommerzielle Enterokinase. Ein deutlicher Vorteil des enterokinaseähnlichen Trypsins gegenüber der kommerziellen Enterokinase ist bei Fusionsprotein A erkennbar, denn dieses kann mit dem veränderten Trypsin viel kürzer inkubiert werden. Für die Reaktion genügt eine Inkubationszeit von ca. 2 Stunden bei einem Verhältnis von 100:1. Die lange Inkubationszeit im Versuch beeinträchtigt das eGFP nicht. Es ist sehr stabil gegenüber der Proteinase.

Da das enterokinaseähnliche Trypsin nicht so spezifisch wie die Enterokinase ist, kann bei zu langer Inkubation ein weiterer Abbau des bereits gespaltenen Fusionsproteins erfolgen, der erwünscht oder unerwünscht sein kann. Dies ist beim GST-Teil der Fusionsproteine B und C zu beobachten. Das neben dem PTH 1-84-eGFP-Fragment bzw. PTH 1-34-Fragment durch die Fusionsproteinspaltung entstandene GST-Fragment wurde offenbar weiter abgebaut, so dass nach ca. 6-8 h nur noch der PTH-eGFP-Teil auf dem Gel zu sehen ist (**Abbildung 29b**). In diesem Fall ist dieses Phänomen sogar vorteilhaft, da hier

vom Fusionsprotein nicht das GST, sondern das PTH-eGFP-Fragment von Interesse ist. Im Fall einer präparativen Anwendung wäre der Abbau des Fusionspartners ein Abreicherungsverfahren und hier sogar erwünscht.

Bei den Fusionsproteinen C und D ist nach der Spaltung jeweils der größere Fusionspartner zu sehen, da der andere zu klein ist, um auf einem Gel der angewendeten Methode analysiert zu werden. Bei beiden Fusionsproteinen ist das enterokinaseähnliche Trypsin der kommerziellen Enterokinase in Bezug auf Reaktionsgeschwindigkeit überlegen.

Die Untersuchungen am enterokinaseähnlichen Trypsin zeigen, dass das rationale Proteindesign, d.h. das Verändern eines Proteins durch gezielte Einführung von Mutationen in sein Gen, relativ leicht durchführbar ist. Voraussetzung ist dabei die genaue Kenntnis der Struktur des Proteins und seines Wirkungsmechanismus, was bei Trypsin der Fall ist.

Wie die Ergebnisse aus Kapitel 4.5 zeigen, lässt sich das enterokinaseähnliche Trypsin mit einfachen Methoden an Säulenmaterial binden und behält dabei seine Aktivität. Um die Reaktion des enterokinaseähnlichen Trypsins zu steuern, kann die Einwirkzeit auf das Substrat jeweils variiert werden. Das Abstoppen der Reaktion kann in einfacher Weise durch pH-Wert-Verschiebung im Reaktionsmedium geschehen. Eine weitere Möglichkeit wäre das Entfernen des enterokinaseähnlichen Trypsins über seinen C-terminalen Histidin-Tag (wie im Versuch Aktivierung im Batch gezeigt).

Im Versuch mit dem an Säulenmaterial immobilisierten enterokinaseähnlichen Trypsin trat in fast allen Elutionsfraktionen noch ungespaltenes Fusionsprotein auf. Das Säulenmaterial besteht aus kleinsten Kügelchen, welche feine Poren besitzen. Auf diesen Kügelchen und in diesen Poren sind enterokinaseähnliche Trypsin-Moleküle gebunden, die möglicherweise z.T. schlecht oder nicht für das Substrat zugänglich sind, d.h. die Aktivität des gesamten, gebundenen, enterokinaseähnlichen Trypsins könnte daher reduziert sein.

Damit die Spaltung quantitativ verläuft, könnte ein anderes Säulenmaterial gewählt werden. Durch Verringerung der Flussrate könnte die Kontaktzeit des Proteins mit dem Säulenmaterial verlängert werden. Noch eine weitere Möglichkeit wäre eine Verlängerung der Säule.

4.7 Ausblick: Einsatzmöglichkeiten des enterokinaseähnlichen Trypsins

Das Beispiel des enterokinaseähnlichen Trypsins zeigt, dass Proteine leicht wandelbar sind und es weitere Möglichkeiten gibt, neuartige Proteinasen zu variieren. Neben dem rationalen Proteindesign ist die gerichtete Evolution (*directed evolution*) eine Alternative, da diese einerseits nicht unbedingt die Kenntnis der Proteinstruktur voraussetzt und

andererseits weniger von neueren Technologien abhängig ist (Stemmer *et al.*, 2003). Dabei werden Proteine und Enzyme auf evolutivem Wege *in vitro*, d.h. durch zufallsbasierte Mutagenese und nachfolgender Identifikation von verbesserten Mutanten verändert und optimiert (Schmid, 2006). Somit kann für jedes Substrat eine geeignete Proteinase entworfen werden. Eine optimale Proteinase zeichnet sich eben nicht nur durch eine hohe Katalyserate aus. Es handelt sich eher um ein Zusammenspiel aus Spezifität, Katalysegeschwindigkeit, Stabilität und weiteren chemischen Eigenschaften.

Eine Herabsetzung der Aktivität des enterokinaseähnlichen Trypsins durch weitere Mutationen könnte die katalytische Reaktion verlangsamen und Nebenreaktionen bei der Substratspaltung reduzieren. Der Austausch des Histidin-Tags des enterokinaseähnlichen Trypsins gegen einen anderen Affinitäts-Tags wäre denkbar. Denn bei der Reinigung von Proteinen mit Ni-NTA-Säulenmaterial gelangen Spuren von Nickel in das Proteinmaterial, die sich nicht hundertprozentig entfernen lassen. Geringste Mengen bleiben zurück und könnten weitere, vor allem biomedizinische, Anwendungen stören.

Anhang

A.1 Verzeichnis der Abkürzungen und englischer Fachbegriffe

<i>active site</i>	aktives Zentrum eines Enzyms
ACE	Angiotensin-Converting-Enzym
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dem.	Aqua demineralisata
<i>bp</i>	base pairs, Basenpaare
Da	Dalton
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DSC	Differentiale Scanningkalorimetrie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektroskopie
<i>fingerprint</i>	Das für eine bestimmte Substanz charakteristische Spektrum
GLP 1	<i>Glucagon like peptide 1</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
Histidin-Tag	Proteinsequenz aus sich mehrfach wiederholenden Histidinen
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus, <i>human immuno-deficiency virus</i>
<i>in silico</i>	im Computerversuch
<i>in vitro</i>	im Laborversuch
<i>in vivo</i>	im Menschen- / Tierversuch
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
IUBMB	International Union of Biochemistry and Molecular Biology
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LDLR	<i>low density lipoprotein receptor</i>
LB-Medium	Luria-Bertrani-Medium
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption time of flight mass spectroscopy</i>
MAM	Abkürzung für Motive, die in der Metalloproteinase 'meprin' vorkommen

MBP	<i>Maltose binding protein</i> , Maltose bindendes Protein
MES	Morpholinoethansulfonsäure
molecular modeling	auf Moleküldaten basierende <i>in silico</i> -Wirkstoffsuche
<i>monitoring</i>	Dauerbeobachtung der Therapie
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MSCR	<i>macrophage scavenger receptor</i>
MWCO	Molecular Weight Cut Off
NCS	<i>non crystallographic symmetry</i> , nicht-kristallografische Symmetrie
NHS-Sepharose	N-Hydroxylaminsuccinimid-Sepharose
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure
NMR	nuklearmagnetische Resonanz-Spektroskopie
OD ₆₀₀	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
<i>on-column</i>	an eine Chromatographiesäule gebunden
<i>oxyanion hole</i>	Oxyanionen-Loch
Pankreas	Bauchspeicheldrüse
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PCMB	<i>para</i> -Chloromercuribenzoat
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	pH-Wert
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PTH	Parathormon
<i>rpm</i>	<i>rounds per minute</i>
<i>rms deviation</i>	<i>root mean square deviation</i> , mittlere quadratische Abweichung
Serpin	Serin-Proteinease-Inhibitor
SBTI	Sojabohnentrypsininhibitor
SDS-PAGE	Sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis
<i>soaking</i>	Hineindiffundieren eines Stoffes in einen Proteinkristall
<i>spacer</i>	DNA- oder Proteinsequenz, die Abstand zwischen zwei Sequenzen hält
<i>sticks</i>	Darstellung der Struktur im Stäbchenmodell
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
<i>target</i>	Ziel, hier: Angriffsort für Wirkstoffe
TF	<i>tissue factor</i>
tPA	<i>tissue type</i> -Plasminogen-Aktivator
<i>tobacco etch virus</i>	Tabakäzvirus

A.2 Abkürzungen der Aminosäuren

Name	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glycin	Gly	G
Glutaminsäure	Glu	E
Glutamin	Gln	Q
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Isoaspartat	Ias	-
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

A.3 IUPAC-Nomenklatur der Inhibitoren

Inhibitornummer	Name nach IUPAC
(1)	Amidinobenzol
(2)	Methyl-N-[(4-Methylphenyl)-Sulfonyl]-Glycyl-3-[Amidino)-methyl]-D-Phenylalaninat
(3)	2,7-Bis-(4-Amidinobenzyliden)-Cycloheptan-1-on
(4)	Benzysulfonyl-D-Seryl-(t-Butyl)-Glycyl-4-Amindino-bezylamid
(5)	Benzysulfonyl-D-Arginyl-Glycyl-4-Amindino-bezylamid
(6)	[4-(6-Chloronaphthalin-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl]-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-1,4'-bipyridinyl-4-yl)-methanon
(7)	6-[1-(1-Aminoethyl)-piperidin-4-yloxy]-1-(7-carbamimidoyl-naphthalin-2-ylmethyl)-2-isopropyl-2,3-dihydro-1H-indol-4-carboxylic acid
(8)	N-2-[4-[(1-Acetimidoyl-4-piperidinyl)-oxy]-N'-3-(7-amidino-2-naphthyl-methylen)-2-carboxyethylsulfonsäureamid
(8)	(7-Carbamidimidoyl-naphthalin-2-ylmethyl)-{4-[1-(1-imino-ethyl)-piperidin-4-yloxy]-phenyl}-sulfamoyl)-essigsäure
(9)	3-(3-Carbamidimidoyl-phenyl)-isoxazol-4-carboxylsäure-(2'-sulfamoyl-biphenyl-4-yl)-amid

Literaturverzeichnis

- Abrahamsen, I., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K. A., Kossiakoff, A. & Wells, J. A. (1991). Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochemistry*, **30**, 4151-4159.
- Acharya, K. R., Sturrock, E. D., Riordan, J. F. & Ehlers, M. R. (2003). ACE revisited: a new target for structure-based drug design. *Nature Rev. Drug Discov.* **2**, 891-902.
- Adler, M., Davey, D. D., Phillips, G. B., Kim, S. H., Jancarik, J., Rumennik, G., Light, D. R. & Whitlow, M. (2000). Preparation, characterization, and the crystal structure of the inhibitor ZK-807834 (CI-1031) complexed with factor Xa. *Biochemistry*, **39**, 12534-12542.
- Anderson, L. E., Walsh, K. A. & Neurath, H. (1977). Bovine enterokinase. Purification, specificity, and some molecular properties. *Biochemistry* **16**, 3354-3360.
- Arnaiz, D. O., Griedel, B. D., Sakata, S. T., Shaw, K. J. & Zhao, Z. (1997). Preparation and formulation of naphthyl-substituted benzimidazole derivatives as anticoagulants. *Patent No.* WO 9721437.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. & Pedersen, J. (2005). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **48**, 1-13.
- Augeri, D. J., Robl, J. A., Betebenner, D. A., Magnin, D. R., Khanna, A., Robertson, J. G., Wang, A., Simpkins, L. M., Taunk, P., Huang, Q., Han, S. P., Abboa-Offei, B., Cap, M., Xin, L., Tao, L., Tozzo, E., Welzel, G. E., Egan, D. M., Marcinkeviciene, J., Chang, S. Y., Biller, S. A., Kirby, M. S., Parker, R. A. & Hamann, L. G. (2005). Discovery and preclinical profile of Saxagliptin (BMS-477118): a highly potent, long-acting, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J. Med. Chem.*, **48**, 5025-5037.
- Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Woessner Jr., F. F. (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Academic Press, London and San Diego.
- Bauer, M. M. T. & Stubbs, M. T. (1999). *Proteolytic Enzymes*, Crystallization of proteinases (E. Sterchi and W. Stöcker, eds.), Heidelberg, Springer Lab Manual, 124-147.
- Blundell, T. L. & Patel, S. (2004). High-throughput X-ray crystallography for drug discovery. *Curr. Opin. in Pharmacol.* **4**, 490-496.
- Bode, W. & Schwager, P. (1975). The refined crystal structure of bovine β -trypsin at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **98**, 693-717.
- Bode, W., Schwager, P. & Huber, R. (1978). The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine Trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **118**, 99-112.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451.
- Böhm, H.-J., Klebe, G. & Kubinyi, H. (1996). *Wirkstoffdesign*. Spektrum Lehrbuch, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Bordusa, F. (2002). Substrate mimetics in protease catalysis: characteristics, kinetics, and synthetic utility. *Curr Protein Pept Sci.* **3**, 159-180.
- Bordusa, F., Wehofskey, N. & Rudolph R. (2005). Method for the synthesis and selective biocatalytic modification of peptides, peptide mimetics and proteins. European Patent EP1534734.
- Bracken, C., Carr, P. A., Cavanagh, J. & Palmer, A. G. (1999). Temperature dependence of intramolecular dynamics of the basic leucine zipper of GCN4: implications for the entropy of association with DNA. *J. Mol. Biol.* **285**, 2133-2146.
- Brandon, C. & Tooze, J. (1999). *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Inc., New York.

- Brandstetter, H., Kühne, A., Bode, W., Huber, R., von der Saal, W., Wirthensohn, K. & Engh, R. A. (1996). X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. Implications for drug design and substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **271**, 29988-29992.
- Breitenlechner, C., Engh, R. A., Huber, R., Kinzel, V., Bossemeyer, D. & Gassel, M. (2004) The typically disordered N-Terminus of PKA can fold as a helix and project the myristoylation site into solution. *Biochemistry*, **43**, 7743-7749.
- Brennan, T. V., Anderson, J. W., Jia, Z., Waygood, E. B. & Clarke, S. (1994). Repair of spontaneously deamidated HPr phosphocarrier protein catalyzed by the L-isoadipate-(D)-aspartate O-methyltransferase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24586-24595.
- Brennan, T. V. & Clarke, S. (1995). Effect of adjacent histidine and cysteine residues on the spontaneous degradation of asparaginyl- and aspartyl-containing peptides. *Int. J. Pept. Protein Res.* **45**(6); 547-53.
- Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W *et al.* (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallog. sect. D*, **54**, 905-921.
- Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P. & Mattern, M. R. (2005). SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **43**, 1-9.
- Carter, W. J., Myles, T., Gibbs, C., Leung, L. & Huntington, J. A. (2004). Crystal structure of anticoagulant thrombin variant E217K provides insights into thrombin allostery. *J. Biol. Chem.* **279**, 26387-26394.
- Cazzulo, J. J., Stoka, V. & Turk, V. (2004). The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* **7**, 1143-1156.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D.C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. **263**, 802-805.
- Chang, T. K., Jackson, D. Y., Burnier, J. P. and Wells, J. A. (1994) Subtiligase: A tool for semisynthesis of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 12544-12548.
- Collaborative Computational Project, Number 4, (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **33**, 1223-1230.
- Corey, D. R. & Craik, C. S., (1992). An investigation into the minimum requirements for peptide hydrolysis by mutation of the catalytic triad of trypsin. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 1784-1790.
- Corey, D. R., McGrath, M. E., Vasquez, J. R., Fletterick, R. J. & Craik, C. S. (1992). An alternate geometry for the catalytic triad of serine proteases. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 4905-4907.
- Craik, C. S., Largman, C., Fletcher, T., Roczniak, S., Barr, P. J., Fletterick, R. & Rutter W. J. (1985). Redesigning trypsin. alteration of substrate specificity. *Science*, **228**, 291-297.
- Craik, C. S., Roczniak, S., Largman, C. & Rutter, W. J. (1987). The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases. *Science*, **237**, 909-913.
- Davie, E. W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochem. J.* **30**, 10363-10370.
- Demuth, H. J., McIntosh, C. H. & Pederson, R. A. (2005). Type 2 diabetes-therapy with dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* **1751**, 33-44.
- Di Cera, E., Guinto, E.R., Vindigni, A., Dang, Q. D., Ayala, Y. M., Wuyi, M. & Tulinsky, A. (1995) The Na⁺ binding site of thrombin. *J. Biol. Chem.* **270**, 22089-22092.
- Di Marco, S. & Priestle, J.P. (1997) Structure of the complex of leech-derived tryptase inhibitor (LDTI) with trypsin and modelling of the LDTI-tryptase system. *Structure*, **5** 1465-74.
- Dixon, M. (1972). The graphical determination of Km and Ki. *Biochem. J.*, **129**(1), 197-202.
- Durcruix, A. & Giege, R. (1992). Crystallization of Nucleic Acids and Proteins, A Practical Approach, *Oxford University Press*, 78-82.
- Einhauer, A. & Jungbauer, A. (2001). The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Bichem. Biophys. Methods*, **49**, 455-465.

- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr.* **60**, 2126-32.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Crystallogr. A*, **47**, 392-400.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. & Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606-2617.
- Faull, A. W., Mayo, C. M., Preston, J. & Stocker, A. (1996). Aminoheterocyclic derivatives as antithrombotic or anticoagulant agents. *Patent No.* WO, 9610022.
- Feldhammer, H., Bode, W. & Huber, R. (1977). Crystal structure of bovine trypsinogen at 1.8 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **111**, 415-438.
- Fuhrmann, C. N., Kelch, B. A., Ota, N & Agard, D.A. (2004). The 0.83 Å resolution crystal structure of α -Lytic protease reveals the detailed structure of the active site and identifies a source of conformational strain. *J. Mol. Biol.* **338**, 999-1013.
- Furie, B. & Furie, B. C. (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell*, **53**, 505-518.
- Fox, J. D & Waugh, D. S. (2003). Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol. Biol.* **55**, 135-147.
- Gerstein, M., Echols, N. (2004). Exploring the range of protein flexibility, from a structural proteomics perspective. *Curr. Opin. in Chem. Biol.*, **8**, 14-19.
- Grant, D. A. & Hermon-Taylor, J. (1976). The purification of human enterokinase by affinity chromatography and immunoabsorption. Some observations on its molecular characteristics and comparisons with the pig enzyme. *Biochem. J.*, **155** (2), 243-254.
- Grünberg, R., Domgall, I., Günther, R., Rall, K., Hofmann, H.-J. & Bordusa, F. (2000). Peptide bond formation mediated by substrate mimetics. *Eur. J. Biochem.*, **267**, 7024-7030.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L. & Rutter, W. J. (1992). Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science*, **255**, 1249-1253.
- Hefti, M. H., Van Vugt-van der Toorn, C. J. G., Dixon, R. & Vervoort, J. (2001). A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal. Biochem.* **295**, 180-195.
- Hey, T., Fiedler, E., Rudolph, R. & Fiedler, M. (2005). Artificial, non-antibody binding proteins for pharmaceutical and industrial applications. *Trends Biotechnol.*, **23** (10), 514-522.
- Higaki, J. N. & Light, A. (1985). The identification of neotrypsinogens in samples of bovine trypsinogen. *Anal. Biochem.* **148**, 111-120.
- Hirayama, F., Koshio, H., Katayama, N., Kurihara, H., Taniuchi, Y., Sato, K., Hisamichi, N., Sakai-Moritani, Y., Kawasaki, T., Matsumoto, Y. & Yanagisawa, I. (2002) The discovery of YM-60828: a potent, selective and orally-bioavailable factor Xa inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 1509-1523.
- Homans, S. W. (2005). Probing the Binding Entropy of Ligand-Protein-Interactions by NMR. *ChemBioChem*. **6**, 1585-1591.
- Hopp, T. P., Prickett, K. S., Price, V L., Libby, R. T., March, C. J., Cerretti, D. P., Urdal, D. L. & Conlon, P. J. (1989). A short polypeptide marker sequence useful for recombinant protein identification and purification. *Bio/Technology*, **6**, 1204-1210.
- Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J. & Steigemann, W. (1974). Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **89**, 73-101.
- Hung, S. H. & Hedstrom, L. (1998). Converting trypsin to elastase: substitution of the S1 site and adjacent loops reconstitutes esterase specificity but not amidase activity. *Protein Eng.* **11**, 669-673.
- Huntington, J. A. & Esmon, C. T. (2003). The molecular basis of thrombin allostery revealed by a 1.8 Å structure of the "slow" form. *Structure*, **11**, 469-479.

- International Union of Biochemistry and Molecular Biology (1992). Enzyme Nomenclature. Academic Press Inc. San Diego, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo and Toronto.
- Jenny, T. J., Mann, K. G. & Lundblad, R. L. (2005). A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr. Purif.* **31**, 1-11.
- Johnson, D. E. (2000). Noncaspase proteases in apoptosis. *Leukemia* **14**, 1695-703.
- Johnson, D. J. D., Adams, T. E. & Huntington, J. A. (2005). Crystal structure of wild-type human thrombin in the Na⁺-free state. *Biochem. J.* **392**, 21-28.
- Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W. & Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for binding protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr. sect. A*, **47**, 110-119.
- Juttler, E., Kohrmann, M. & Schellinger, P. D. (2006). Therapy for early reperfusion after stroke. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.*, **3**, 656-663.
- Kamata, K., Kawamoto, H., Homma, T., Iwama, T. & Kim, S. H. (1998). Structural basis for chemical inhibition of human blood coagulation factor Xa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 6630-6635.
- Kellner, R., Lottspeich, F. & Meyer, H. E. (1999), *Microcharacterization of Proteins*, Wiley-VCH, Weinheim.
- Kendrew, J. C., Perutz, M. F. (1957). X-ray studies of compounds of biological interest. *Annu Rev Biochem.*, **26**, 327-72.
- Kieffer, T. J., McIntosh, C. H. S. & Pederson, R. A. (1995). Degradation of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and truncated glucagon-like peptide 1 *in vitro* and *in vivo* by dipeptidyl peptidase IV. *Endocrinology*, **136**, 3585-3596.
- Kim, A. R., Doherty-Kirby, A., Laijoe, G., Rylett, R. J. & Shilton, B. H. (2005). Two methods of large-scale purification of recombinant human choline acetyltransferase. *Protein Expr. Purif.* **40**, 107-117.
- Kim, S. J., Park, Y. & Hong, H. J. (2005). Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies. *Mol. Cells*, **20**, 17-29.
- Kim, D., Wang, L., Beconi, M., Eiermann, G. J., Fisher, M. H., He, H., Hickey, G. J., Kowalchick, J. E., Leiting, B., Lyons, K., Marsilio, F., McCann, M. E., Patel, R. A., Petrov, A., Scapin, G., Patel, S. B., Roy, R. S., Wu, J. K., Wyvratt, M. J., Zhang, B. B., Zhu, L., Thornberry, N. A. & Weber, A. E. (2005). 2R)-4-oxo-4-[3-(trifluoromethyl)-5,6-dihydro-[1,2,4]triazolo[4,3-a]pyrazin-7(8H)-yl]-1-(2,4,5-trifluorophenyl)butan-2-amine: a potent, orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes. *J. Med. Chem.* **48**, 141-51.
- Klebe, G. (2001). Wirkstoffdesign bei der Entwicklung substratähnlicher HIV-Protease-Hemmstoffe. *Pharm. Unserer Zeit.*, **30**, 194-201.
- Klinge, C. M. (2001) Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res.* **29**, 2905-19.
- Kossiakoff, A. A. (1988). The tertiary structure is a principal determinant to protein deamidation. *Science* **240**, 191-194.
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F. & Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteinases, *Cell. Mol. Life. Sci.* **60**, 2427-2444.
- Kubinyi, H. (2006). *Comprehensive Medicinal Chemistry II, Vol 3 Technologies*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Kühne, W. F. (1876). Über die Verdauung der Eiweißstoffe durch den Pankreassaft. *Virchows Arch.* **39**, 130 (reproduziert von Gutfreund, H. (1976). *FEBS Lett.* **62** (suppl.), E1-E12).
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lai, W. T., Chang, C. H., Tang, Y., Bronson, R & Tung, C. H. (2004). Early diagnosis of osteoarthritis using cathepsin B sensitive near-infrared fluorescent probes. *Osear. Cartil.* **12**, 239-244.

- Laskowski, M. J. & Kato, I. (1980). Protein inhibitors of proteinases. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 593-626.
- LaVallie, E. R., Rehemtulla, A., Racie, L. A., DiBlasio, E. A., Ferenz, C., Grant, K. L., Light, A. & McCoy, J. M. (1994). Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J. Biol. Chem.* **268**, 23311-23317.
- Leong, L. E. (1999). The use of recombinant fusion proteinases in the affinity purification of recombinant proteins. *Mol. Biotechnol.* **12**, 269-274.
- Liepnieks, J. J. & Light, A. (1979). The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine Enterokinase. *J. Biol. Chem.* **254**, 1677-1683.
- Liew, O. W., Ching Chong, J. P., Yandle, T. G. & Brennan, S. O. (2005). Preparation of recombinant thioredoxin fused N-terminal proCNP: analysis of enterokinase cleavage products reveals new enterokinase cleavage sites. *Protein Expr. Purif.* **41**, 332-340.
- Light, A. & Fonseca, P. (1984). The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J. Biol. Chem.* **259**, 13195-13198.
- Mäler, L., Blankenship, J., Rance, M. & Chazin, W. J. (2000) Site-site communication in the EF-hand Ca²⁺-binding protein calbindin D9k. *Nat Struct Biol.* **7**, 245-250.
- Loh, A. P., Pawley, N., Nicholson, L. K. & Oswald, R. E. (2001). An increase in side chain entropy facilitates effector binding: NMR characterization of the side chain methyl group dynamics in Cdc42Hs. *Biochemistry* **40**, 4590-4600.
- Look, M. P. & Foekens, J. A. (1999). Clinical relevance of the urokinase plasminogen activator system in breast cancer. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* **107**, 150-159.
- Lorber, B. & Giege, R. (1996). Containerless protein crystallization in floating drops: application to crystal growth monitoring under reduced nucleations conditions. *J. Crystal Growth*, **168**, 214-216.
- Lorentsen, R. H., Fynbo, C. H., Thøgersen, H. C., Etzerodt, M., Holtet, T. L. (2005). Expression, refolding, and purification of recombinant human granzyme B. *Protein Expr. Purif.* **39**, 18-26.
- Lowenson, J. D & Clarke, S. (1992). Recognition of D-aspartyl residues in polypeptides by the erythrocyte L-isoaspartyl/D-aspartyl protein methyltransferase. Implications for the repair hypothesis. *J. Biol. Chem.* **267**, 5985-5995.
- Lu, D., Fütterer, K., Korolev, S., Zheng, X., Tan, K., Waksman, G. & Sadler, J. E. (1999) Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide *J. Mol. Biol.* **292** (2), 361-373.
- Maignan, S., Guilloteau, J.-P., Pouzieux, S., Chai-Sledeski, Y. M., Becker, M. R., Klein, S. I., Ewing, W. R., Pauls, H. W., Spada, A. P. & Mikol, V. (2000). Crystal structures of human factor Xa complexed with potent inhibitors. *J. Med. Chem.* **43**, 3226-3232.
- Malakov, M. P., Mattern, M. R., Malakova, O. A., Drinker, M., Weeks, S. D. & Butt, T. R. (2004). SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J. Struct. Funct. Genomics* **5**, 75-86.
- Mao, H. (2004). A self-cleavable sortase fusion for one-step purification of free recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **37**, 253-263.
- Matsushima, M., Ichinose, M., Yahagi, N., Kakei, N., Tsukada, S., Miki, K., Kurokawa, K., Tashiro, K., Shiokawa, K., Shinomiya, K., Umeyama, H., Inoue, H., Takahashi, T & Takahashi, K. (1994). Structural characterisation of porcine enteropeptidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 19976-19982.
- Maroux, S., Baratti, J & Desnuelle, P. (1971). Purification and specificity of porcine enterokinase *J. Biol. Chem.* **246**, 5031-5039.
- McKeage, K. & Goa, K. L. (2001). Insulin glargine: a review of its therapeutic use as a long-acting agent for the management of type 1 and 2 diabetes mellitus. *Drugs*, **61**, 1599-1624.
- McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallography. *Eur. J. Biochem.* **189**, 1-23.

- Melchor, J. P. & Strickland, S. (2005). Tissue plasminogen activator in central nervous system physiology and pathology. *Thromb. Haemost.* **93**, 655-660.
- Mentlein, R., Gallwitz, B. & Schmidt, W. E. (1993). Dipeptidyl-peptidase IV hydrolyses gastric inhibitory polypeptide glucagon-like peptide-1 (7-36) amide, peptide histidine methionine and is responsible for their degradation in human serum. *Eur. J. Biochem.* **214**, 829-835.
- Najbauer, J., Orpiszewski, J. & Aswad, D. W. (1996) Molecular aging of tubulin: accumulation of isoaspartyl sites *in vitro* and *in vivo*. *Biochemistry*, **35**, 5183-90.
- Nar, H., Bauer, M., Schmid, A., Stassen, J. M., Wienen, W., Pripke, H. W., Kauffmann, I. K., Ries, U. J. & Huel, N. H. (2001). Structural basis for inhibition promiscuity of dual specific thrombin and factor Xa blood coagulation inhibitors. *Structure (Camb)*. **9**, 29-37.
- Natesh, R., Schwager, S. L., Sturrock, E. D. & Acharya, K. R. (2003). Crystal structure of the human angiotensin-converting enzyme-lisinopril complex. *Nature* **421**, 551-554.
- Neurath, H. (1984). Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350-357.
- Nienhaber, V. L., Davidson, D., Edalji, R., Giranda, V. L., Klinghofer, V., Henkin, J., Magdalinos, P., Mantei, R., Merrick, S., Severin, J. J., Smith, R. A., Stewart, K., Walter, K., Wang, J., Wendt, M., Weitzberg, M., Zhao, X. & Rockway, T. (2000). Structure-directed discovery of potent non-peptidic inhibitors of human urokinase that access a novel binding subsite. *Structure*. **8**, 553-563.
- Nilsson, J., Ståhl, S., Lundeberg, J., Uhlen, M., Nygren, P. Å. (1997). Affinity fusion strategies for detection, purification and immobilization of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **11**, 1-16.
- Noguchi, S., Miyawaki, K & Satow, Y. (1998). Succinimide and isoaspartate residues in the crystal structures of hen egg-white lysozyme complexed with tri-N-acetylchitotriose. *J. Mol. Biol.* **278**, 231-238.
- Olsen, O. S. & Falholt, P. (1998). The role of enzymes in modern detergency. *J. Surfact. Deterg.*, **1**, 555-567.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (2001). Precision of data in diffraction experiments. NATO Science Series, Series I: Life and Behavioural Sciences *Methods in Macromolecular Crystallography*, **325**, 55-60.
- Padmanabhan, K., Padmanabhan, K. P., Park, C. H., Bode, W., Huber, R., Blankenship, D. T., Cardin, A. D. & Kisiel, W. (1993). Structure of human Des(1-45) factor Xa at 2.2Å resolution. *J. Mol. Biol.* **232**, 947-966.
- Palmer, A. G., Kroenke, C. D., Loria, J. P. (2001). Nuclear magnetic resonance methods for quantifying microsecond-to-millisecond motions in biological macromolecules. *Methods Enzymol.* **339**, 204-238.
- Pavlov, I. P. (1902) *The Work of the Digestive Glands*, 1st edn (trans. Thompson, W.H.). London: Charles Griffin & Co.
- Perkins, S. J. & Wuthrich, K. (1980). Conformational transition from trypsinogen to trypsin. ¹H nuclear magnetic resonance at 360 MHz and ring current calculations. *J. Mol. Biol.*, **138**, 43-64.
- Perona, J. J. & Craik, C. S. (1995). Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* **4**, 337-360.
- Phillips, G. B., Buckman, B. O., Davey, D. D., Eagen, K. A., Guilford, W. J., Hinchman, J. *et al.* (1998). Discovery of *N*-[2-[5-[amino(imino)methyl]-2-hydroxy-phenoxy]-3,5-difluoro-6-[3-(4,5-dihydro-1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)phenoxy]pyridin-4-yl]-*N*-methyl-glycine (ZK-807834): a potent, selective, and orally active inhibitor of the blood coagulation enzyme factor Xa. *J. Med. Chem.* **41**, 4240-4250.
- Pineda, A. O., Chen, Z.-W., Bah, A. B., Garvey, L. C., Scott Mathews, F. & Di Cera, E. (2006). Crystal structure of thrombin in a self-inhibited conformation. *J. Biol. Chem.* **281**, 32922-32928.
- Pinto, D. J., Orwat, M. J., Wang, S., Fevig, J. M., Quan, M. L., Amparo, E., Cacciola, J., Rossi, K. A., Alexander, R. S., Smallwood, A. M., Luetzgen, J. M., Liang, L., Aungst, B. J., Wright, M. R., Knabb, R. M., Wong, P. C., Wexler, R. R., Lam, P. Y. (2001). Discovery of 1-[3-

- (aminomethyl)phenyl]-N-3-fluoro-2'-(methylsulfonyl)-[1,1'-biphenyl]-4-yl]-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide (DPC423), a highly potent, selective, and orally bioavailable inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J. Med. Chem.* **44**, 566-578.
- Porath, J. Immobilized metal ion affinity chromatography. *Protein Expr. Purif.* **3**, 263-281.
- Pruitt, J.R., Pinto, D.J., Estrella, M.J., Bostrom, L.L., Knabb, R.M., Wong, P.C., Wright, M.R. & Wexler, R.R. (2000). Isoxazolines and isoxazoles as factor Xa inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **10**, 685-689.
- Purbey, P. K., Jayakumar, P.C., Deepalakshmi, P. D., Patole, M. S. & Galande, S. (2005). GST fusion vector with caspase-6 cleavage site for removal of fusion tag during column purification. *Biotechniques*, **38**, 360-364.
- Rais-Beghdadi, C., Roggero, M. A., Fasel, N. & Reymond, C. D. (1998). Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **74**, 95-103.
- Rami, B. & Schober, E. (1997). Postprandial glycaemia after regular and lispro insulin in children and adolescents with diabetes. *Eur. J. Pediatr.*, **156**, 838-40.
- Rauh, D., Klebe, G. & Stubbs, M. T. (2004). Understanding protein-ligand interactions: The price of protein flexibility. *J. Mol. Biol.* **335**, 1325-1341.
- Rauh, D., Klebe, G., Stuerzebecher, J. & Stubbs, M. T. (2003). ZZ made EZ: influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity. *J. Mol. Biol.* **330**, 761-770.
- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G. & Stubbs, M. T. (2002). Trypsin mutants for structure-based drug design: expression, refolding and crystallisation. *Biol. Chem.*, **383**, 1309-1314.
- Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (2000). MEROPS: The Peptidase Database. *Nucleic Acids Res.* **28**, 323-325.
- Read, R. J. & James, M. N. G. (1988) Refined crystal structure of *Streptomyces griseus* trypsin at 1.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **200**, 523-551.
- Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Stürzebecher, J. & Stubbs, M. T. (1998). Structural and functional analyses of benzamidine-based inhibitors in complex with trypsin: implications for the inhibition of factor Xa, tPA and urokinase. *J. Med. Chem.*, **42** (27), 5445-5456.
- Rester, U., Moser, M., Huber, R. & Bode, W. (2000). L-Isospartate 115 of porcine B-trypsin promotes crystallisation of its complex with bdellastasin. *Acta Cryst. D*, **56**, 581-588.
- Reunig, U., Magdolen, V., Wilhelm, O., Fischer, K., Lutz, V., Graeff, H. & Schmitt, M. (1998). Multifunctional potential of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis. *Int. J. Oncol.* **13**, 893-906.
- Reyda, S., Sohn, C., Klebe, G., Rall, K., Ullmann, D., Jakubke, H.-D. & Stubbs, M. T. (2003) Reconstructing the binding site of factor Xa in trypsin reveals ligand-induced structural plasticity. *J. Mol. Biol.* **325**, 963-977.
- Rhodes, G., (2000). *Crystallography Made Crystal Clear*, 2. Auflage, Academic Press, San Diego, London.
- Roher, A. E., Lowenson, J. D., Clarke, S., Woldow, C., Wang, R., Cotter, R. J., Reardon, I. M., Zurcher-Neely, H. A., Heinridson, R. L., Ball, M. J. & et al (1993). Structural alterations in the peptide backbone of beta-amyloid case protein may account for its deposition and stability in Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **268**, 6490-6505.
- Rudolph, R., Böhm, G., Lilie, H. & Jaenicke, R. (1996). *Folding proteins*. Practical Approach Series, Oxford University Press.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Schatz, H. (Hrsg.), (2006). *Diabetologie kompakt. Grundlagen und Praxis*, 3. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- Schechter, I., Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **27** (2), 157-62.

- Schellenberger, V., Turck, C. W. & Rutter, W. J. (1994). Role of the S'-subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, α -lytic protease, and cercarial protease from *Schistosoma mansoni*. *Biochemistry* **33**, 4251-4257.
- Schmid, R. D. (2006). *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnologie*, 2. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- Smith, D. B. & Johnson, K. S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with Glutathion S-transferase. *Gene* **67**, 31-40.
- Schenone, M., Furie, B. C. & Furie, B. (2004). The blood coagulation cascade. *Curr. Opin. Hematol.* **11**, 272-277.
- Schrimpf, G. (Hrsg.), (2002). *Gentechnische Methoden*, 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Stürzebecher, U., Schuster, O., Stürzebecher, J. & Steinmetzer, T. (2006). New substrate analogue inhibitors of factor Xa containing 4-amidinobenzylamid as P1 residue: Part 1, *Med. Chem.* **2**, 349-361.
- Shaw, K. J., Guilford, W. J., Dallas, J. L., Koovakkaat, S. K., McCarrick, M. A., Liang, A., Light, D. R. & Morrissey, M. M. (1998). (Z,Z)-2,7-Bis(4-amidinobenzylidene)cycloheptan-1-one: identification of a highly active inhibitor of blood coagulation factor Xa. *J. Med. Chem.* **41**, 5331-5356.
- Shiozaki, E. N., Chai J, Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R. & Shi, Y. (2003). Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol. Cell* **11**, 519-527.
- Shotton, D. M. & Hartley, B. S. (1970). Amino-acid Sequence of Porcine Pancreatic Elastase and its Homologies with other Serine Proteinases *Nature* **225**, 802-806.
- Sprang, S., Standing, T., Flettrick, R. J., Stroud, R. M., Finer-Moore, J., Xuong, N. H., Hamlin, R., Rutter, W. J. & Craik, C. S. (1987). The three-dimensional structure of Asn102 mutant of trypsin: role of Asp102 in serine protease catalysis. *Science* **237**, 905-909.
- Stemmer, W. & Holland, B. (2003). Survival of the fittest molecule. *Am. Sci.* **91**, 526-533.
- Stryer, L. (1991) *Biochemie*, 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York.
- Stubbs, M.T. (2006) *Protein crystallography*. Chapter 3.21, Comprehensive Medicinal Chemistry II (D.J. Triggle and J.B. Taylor, eds.) Elsevier (Oxford), 449-472.
- Stubbs, M. T., Huber, R. & Bode, W. (1995). Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin. *FEBS Lett.* **375**, 103-107.
- Stubbs, M. T., Reyda, S., Dullweber, F., Möller, M., Klebe, G., Dorsch, D., Mederski, W. W. K. R. & Wurziger, H. (2002). pH-dependent binding modes observed in trypsin crystals: lessons for structure-based drug design. *ChemBioChem* **02-03** 246-249.
- Stürzebecher, J., Prasa, D., Hauptmann, J., Vieweg, H. & Wikstrom, P. (1997). Synthesis and structure-activity relationships of potent thrombin inhibitors: piperazides of 3-amidinophenylalanine. *J. Med. Chem.* **49**(19), 3091-3099.
- Stroud, R.M., Kay, L. M. & Dickerson, R. E. (1974). The structure of bovine trypsin: electron density maps of the inhibited enzyme at 5 Å and at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **83**, 185-208.
- Thews, G., Mutschler, E. & Vaupel, P. (1999). *Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W. & Kopple, K. D. (2002). Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J. Med. Chem.* **45**, 2615-2623.
- Watanabe, A., Takio, K. & Ihara, Y. (1999). Deamidation and isoaspartate formation in smeared tau in paired helical filaments. *J. Biol. Chem.* **274** (11), 7368-7378.
- Waugh, D. S. (2005). Making the most of affinity tags. *Trends Biotechnol.* **23**, 316-320.

- Weiner, M. P., Costa, G. L., Schoettlin, W., Cline, J., Mathur, E. & Bauer, J. C. (1994). Site-directed mutagenesis on double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene*, **151**, 119-123.
- Whitlow, M., Arnaiz, D. O., Buckman, B. O., Davey, D. D., Griedel, B., Guilford, W. J., Koovakkat, S. K., Liang, A., Mohan, r., Phillips, G. B., Seto, M., Shaw, K. J., Xu, W., Zhao, Z., Light, D. R. & Morrissey, M. M. (1999). Crystallographic analysis of potent and selective factor Xa inhibitors complexed to bovine trypsin. *Acta Cryst. sect D*, **55**, 1395-1404.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131-137.
- Yang, D. & Kay, L. E. (1989). Contributions to conformational entropy arising from bond vector fluctuations measured from NMR-derived order parameters: application to protein folding. *J Mol Biol.* **263**, 369-382.
- Zaman, M. A., Oparil, S. & Calhoun, D. A. (2002). Drugs targeting the renin-angiotensin-aldosterone system. *Nature Rev. Drug Discov.* **1**, 621-636.
- Zartler, E. Z. and Shapiro, M. J. (2005). Fragonomics: fragment-based drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **9**, 366-370.
- Zuendorf, I. & Dingermann, T. (2001). Vom Rinder-, Schweine-, Pferde-Insulin zum Humaninsulin: Die biotechnische und gentechnische Insulin-Herstellung: Bereitstellung ausreichender Mengen von Humaninsulin. *Pharm. Unserer Zeit.*, **30**, 27-32.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

‚Untersuchungen zum Verständnis von Substrat-Liganden-Affinität mit Hilfe von *Proteinase Engineering*‘

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Frankfurt im Oktober 2007

Anastasia Tziridis

Lebenslauf

Anastasia Tziridis

Geburtstag	26.03.1975
Geburtsort	Frankfurt/Main
1980-1994	Grundschule und Gymnasium, Frankfurt/Main
07/1994	Abitur, Friedrich-Dessauer-Gymnasium, Frankfurt/Main
09/1994 – 08/1996	PTA-Schule Frankfurt/Main
03/1997	Prüfung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin
04/1997 – 03/2001	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
05/2001 – 10/2001	Pharmaziepraktikantin bei der Hexal AG, Holzkirchen
11/2001 – 04/2002	Pharmaziepraktikantin in der Apotheke im Hauptbahnhof, Leipzig
06/2002	Erteilung der Approbation als Apothekerin
06/2002 – 08/2002	Anstellung als Apothekerin in der Apotheke im Hauptbahnhof, Leipzig
11/2002 - 02/2006	Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Physikalische Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
02/2005 - 02/2006	Assoziiertes Mitglied im Graduiertenkolleg GK1026 ‚Conformational transitions in macromolecular interactions‘ der Deutschen Forschungsgemeinschaft
03/2006 - 08/2007	Trainee für Betriebsassistenten, Provadis GmbH/ Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main
seit 09/2007	Stellvertretende Qualitätsleiterin, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt/Main