

**Flexibilität und Spezifität in Protein-Protein-Wechsel-
wirkungen am Beispiel der Komplexbildung von Trypsin-
Varianten und dem Proteaseinhibitor Eglin C**

Dissertation

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

eingereicht bei der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I der
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Anja Menzel
aus Halberstadt

Halle (Saale), 22.12.2009

Erstgutachter: Prof. Dr. Milton T. Stubbs

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Baumann

Drittgutachter: Prof. Dr. Renate Ulbrich-Hofmann

Denn die Dinge, die wir erst lernen müssen, bevor wir sie tun, lernen wir beim Tun.

Aristoteles

Inhalt

Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	11
1 Einleitung	13
1.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen	13
1.2 Schlüssel-Schloß-Prinzip, induzierter Fit und konformationelle Selektion	14
1.3 Proteasen in der Biologie und Medizin	14
1.4 Katalysemechanismus von Serinproteasen	15
1.5 Substratspezifitäten von Serinproteasen	16
1.6 Trypsin	17
1.7 Blutgerinnung	19
1.8 Faktor Xa	22
1.9 Struktur der Bindetaschen von Trypsin und Faktor Xa	24
1.10 Faktor Xa-ähnliche Trypsin-Varianten als Modellsystem für Faktor Xa	29
1.11 Ausgewählte Faktor Xa-ähnliche Trypsin-Varianten	30
1.12 Makromolekulare Inhibitoren von Serinproteasen	34
1.13 Eglin C und trypsin-spezifisches Eglin C	36
1.14 Zielsetzung der Arbeit	37
2 Röntgenstrukturanalyse	39
2.1 Allgemeines	39
2.1.1 Das physikalische Prinzip der Streuung von elektromagnetischer Strahlung an Materie	39
2.1.2 Auflösung	39
2.1.3 Warum verwendet man Kristalle?	40
2.2 Kristallisation von Proteinen	40
2.2.1 Das Prinzip der Kristallisation	40
2.2.2 Faktoren, die die Löslichkeit von Proteinen beeinflussen	41
2.2.3 Das Kristallisationsexperiment	42
2.2.4 Eigenschaften von Proteinkristallen	42
2.2.5 Symmetrie von Kristallen	43
2.3 Das Streuexperiment	45
2.3.1 Vorbereitung der Kristalle	45
2.3.2 Röntgenquellen	46
2.3.3 Röntgendetektoren	47
2.3.4 Durchführung des Röntgenstreuexperimentes	47
2.3.5 Datenauswertung	48
2.3.6 Qualität der Röntgendaten	48
2.4 Strukturbestimmung	49
2.4.1 Streuung von Röntgenstrahlen an Kristallen	49
2.4.2 Vom Streudatensatz zur Struktur	50
2.4.3 Das kristallographische Phasenproblem	51
2.4.4 Methoden zur Phasenbestimmung	51

2.4.5 Die Methode des Molekularen Ersatzes	52
2.4.6 Strukturverfeinerung und Validierung	53
2.4.7 Manuelle Anpassungen und Elektronendichtedarstellungen	54
2.5 Strukturvergleiche und Strukturüberlagerungen	54
3 Materialien & Methoden	57
3.1 Materialien	57
3.1.1 Chemikalien	57
3.1.2 Standards und <i>Kits</i>	57
3.1.3 Enzyme und weitere Proteine	57
3.1.4 Medien	58
3.1.5 Stammlösungen	59
3.1.6 Bakterienstämme und Plasmide	59
3.1.7 Lösungen und Puffer	60
3.1.8 Apparaturen	64
3.2 Molekularbiologische Methoden	65
3.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide	65
3.2.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Trypsin-Varianten	66
3.2.1.2 Herstellung des Expressionsplasmids der Eglin C-Mutante	66
3.2.2 Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	67
3.2.3 Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	67
3.2.4 Kultivierung und Konservierung der <i>E. coli</i> -Kulturen	67
3.2.5 Plasmidpräparation	67
3.2.6 Restriktionsverdau	68
3.2.7 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten	68
3.2.8 Ligation	68
3.3 Proteinchemische Methoden	68
3.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	68
3.3.2 Elektrophoretische Trennung und Analyse von Proteinen	69
3.3.3 Expression von Trypsin-Varianten	69
3.3.4 Isolierung und Solubilisierung von <i>Inclusion Bodies</i>	69
3.3.5 Renaturierung der Trypsin-Varianten	70
3.3.6 Aktivierung der Trypsin-Varianten	70
3.3.7 Reinigung von Trypsin-Varianten an SBTI-Agarose	71
3.3.8 Expression von trypsin-spezifischem Eglin C	71
3.3.9 Reinigung von trypsin-spezifischem Eglin C an Ni-NTA-Agarose	71
3.4 Faktor Xa-Inhibitionsassay	72
3.5 Kalorimetrie	72
3.5.1 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	72
3.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	74
3.6 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)	77
3.6.1 Probenvorbereitung	78
3.6.2 Datenaufnahme und Analyse	78
3.7 Röntgenkristallstrukturanalyse	78
3.7.1 Herstellung der Proteinkomplexe	79
3.7.2 Kristallisation	79
3.7.3 Datensammlung	80
3.7.4 Datenprozessierung	80
3.7.5 Strukturlösung und Verfeinerung	80

3.7.6 Graphische Darstellung	81
3.7.7 Analyse und Beschreibung der Strukturen	81
4 Ergebnisse	83
4.1 Die bearbeiteten Proteine und Proteinkomplexe	83
4.1.1 Expression und Reinigung der Trypsin-Varianten	83
4.1.2 Expression und Reinigung von trypsin-spezifischem Eglin C	85
4.2 Röntgenstrukturanalysen	86
4.2.1 Herstellung der Proteinkomplexe	86
4.2.2 Kristallisation	88
4.2.3 Streuexperimente	89
4.2.4 Strukturlösung	91
4.2.5 Strukturverfeinerung	92
4.2.6 Beschreibung der Gesamtstrukturen	93
4.2.7 Struktur und Strukturvergleiche	95
4.2.8 Beschreibung der Kontaktfläche zwischen den Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante-L45K in den Komplexen	98
4.2.9 Detaillierte Beschreibung der Konformation der 175er-Schleife in den vier untersuchten Proteinkomplexen	100
4.2.9.1 Die 175er-Schleife im Komplex <i>TA-E</i>	100
4.2.9.2 Die 175er-Schleife im Komplex <i>TGA-E</i>	100
4.2.9.3 Die 175er-Schleife im Komplex <i>TPA-E</i>	102
4.2.9.4 Die 175er-Schleife im Komplex <i>TGPA-E</i>	103
4.2.10 Einfluß der Bindung von Eglin C-L45K auf die Konformation der 99er-Schleife in den Trypsin-Varianten	104
4.2.11 Berechnete Stabilität der vier untersuchten Komplexe	105
4.2.12 Modellkomplexe von nativem Trypsin und der katalytischen Domäne von Faktor Xa mit der Eglin C-Mutante-L45K	106
4.3 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)	107
4.4 Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen mittels Kalorimetrie	112
4.4.1 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)	113
4.4.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)	116
4.5 Faktor Xa-Inhibitionsassay	121
5 Diskussion	123
6 Zusammenfassung	135
7 Ausblick	136
8 Literaturverzeichnis	138
Anhang	146
Danksagung	149
Erklärung	150
Lebenslauf	151

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse von Peptidbindungen.	14
Abb. 2: Katalysemechanismus von Serinproteasen.	16
Abb. 3: Konvention zur Nomenklatur von Substrat -und Bindetaschen in Proteasen.	17
Abb. 4: Ausschnitt des aktiven Zentrums von bovinem Trypsin.	19
Abb. 5: Vereinfachtes Schema der Blutgerinnungskaskade.	20
Abb. 6: Vereinfachte schematische Darstellung der Topologie von Faktor X.	23
Abb. 7: Ausschnitt des aktiven Zentrums von Faktor Xa.	24
Abb. 8: Schematische Darstellung der Bindetaschen von bovinem Trypsin (a) und humanem Faktor Xa (b).	25
Abb. 9: Oberflächendarstellung der katalytischen Domänen von bovinem Trypsin (a) und humanen Faktor Xa (b).	26
Abb. 10: Strukturformeln zweier niedermolekularer Inhibitoren.	27
Abb. 11: Ligandenbindetasche von humanem Faktor Xa.	28
Abb. 12: Oberflächendarstellungen der flexiblen Schleife der <i>Triple-Glu</i> Trypsin-Variante im Komplex mit Benzamidin (a), (b) und einem Faktor Xa-spezifischen Inhibitor, der Zeneca-Verbindung (c).	29
Abb. 13: Strukturelle Darstellung der <i>Triple</i> Variante.	30
Abb. 14: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von Eglin C.	37
Abb. 15: Phasendiagramm einer hypothetischen Proteinlösung.	41
Abb. 16: Schema eines „hängenden Tropfens“.	42
Abb. 17: Kristallgitter und Elementarzelle.	44
Abb. 18: Schematische Darstellung eines Streuexperiments.	45
Abb. 19: Schematischer Aufbau eines Kompensationskalorimeters.	74
Abb. 20: Theoretische Titrationskurve für eine einfache Bindungsreaktion $A + B \rightarrow AB$.	77
Abb. 21: 15%-ige SDS-PAGE von der Herstellung der Trypsin-Varianten am Beispiel von <i>Triple-Ala</i> Trypsin.	84

Abb. 22: 16%-ige Tris/Tricine SDS-PAGE des trypsin-spezifischen Eglin Cs.	85
Abb. 23: Charakteristisches Laufprofil eines Komplexes aus <i>Triple-Ala</i> Trypsin und trypsin-spezifischem Eglin C.	87
Abb. 24: 15%-ige SDS-PAGE von dem Eluat des Gelfiltrationslaufes des Komplexes aus <i>Triple-Ala</i> Trypsin und trypsin-spezifischem Eglin C.	87
Abb. 25: Dreidimensionale Kristalle der vier untersuchten Proteinkomplexe.	89
Abb. 26: Überlagerung der Kristallstrukturen aus einer Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K.	97
Abb. 27: Oberflächendarstellung einer Trypsin-Variante (a) und trypsin-spezifischem Eglin C (b).	99
Abb. 28: <i>Down</i> -Konformation der 175er-Schleife im Komplex <i>TA-E</i> .	100
Abb. 29: <i>Down</i> -Konformation der 175er-Schleife im Komplex <i>TGA-E</i> .	101
Abb. 30: Einfluß der Glu217-Gly40-Interaktion.	101
Abb. 31: Ausschnitt der Ketten AB (a) und CD (b) im Komplex <i>TPA-E</i> .	103
Abb. 32: <i>Up</i> -Konformation der 175er-Schleife im Komplex <i>TGPA-E</i> (a) und in der Überlagerung mit humanem Faktor Xa (b).	104
Abb. 33: Einfluß der Eglin C-L45K-Bindung auf die Konformation der 99er-Schleife in den Trypsin-Varianten.	105
Abb. 34: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum von ^{13}C , ^{15}N - <i>Triple-Ala</i> Trypsin.	109
Abb. 35: Resonanzzuordnung des ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrums von ^{13}C , ^{15}N - <i>Triple-Ala</i> Trypsin.	110
Abb. 36: Schematische Darstellung von <i>Triple-Ala</i> Trypsin koloriert anhand zugeordneter und nicht zugeordneter Resonanzen.	110
Abb. 37: Überlagerung der ^1H - ^{15}N Korrelationsspektren von deuteriertem und nicht deuteriertem ^{13}C , ^{15}N - <i>Triple-Ala</i> Trypsin	111
Abb. 38: ^1H - ^{15}N Korrelationsspektrum von ^{13}C , ^{15}N - <i>Triple-Glu-Phe-Ala</i> Trypsin.	112
Abb. 39: Beispiel eines reversiblen und irreversiblen DSC-Laufs der <i>Triple-Glu-Ala</i> Trypsin-Variante.	114
Abb. 40: Graphische Darstellung der mittels DSC beobachteten thermischen Denaturierung der vier ausgewählten Trypsin-Varianten.	114

-
- Abb. 41:** Kalorimetrische Titration der Variante *Triple-Ala* und der Eglin C-Mutante-L45K in HEPES-gepufferter Lösung. 117
- Abb. 42:** Kalorimetrische Titrationsen der ausgewählten Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten bzw. inaktivem Trypsin und der Eglin C-Mutante-L45K in MES-gepufferter Lösung. 118
- Abb. 43:** Thermodynamische Parameter der Bindung von inaktivem bovinen Trypsin bzw. der vier ausgewählten katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten an trypsin-spezifisches Eglin C. 120
- Abb. 44:** Enzymkinetischer Inhibitionsassay. 122
- Abb. 45:** Das mit verschiedenen Methoden untersuchte Trypsin-Eglin C-System. 123

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Unterschiede in der Primärstruktur zwischen den ausgewählten Trypsin-Varianten.	30
Tab. 2: Vergleich der Konformation der 175er-Schleifen und der Inhibitorbindenkonstanten für einen potenten Faktor Xa-Inhibitor, der Zeneca-Verbindung, zwischen den ausgewählten Trypsin-Varianten.	34
Tab. 3: Ausbeuten der Trypsin-Varianten.	84
Tab. 4: Ausbeute an trypsin-spezifischem Eglin C.	86
Tab. 5: Ausbeuten der Proteinkomplexe aus den jeweiligen Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante-L45K.	88
Tab. 6: Datensammlungsstatistik.	90
Tab. 7: Datenprozessierungsstatistik.	90
Tab. 8: Verfeinerungsstatistik.	92
Tab. 9: Vergleich der <i>rmsd</i> -Werte zwischen Trypsin-Varianten (Kette A vs. C), Eglin C-Mutanten-L45K (Kette B vs. D) und den beiden Komplexen (AB vs. CD) in der asymmetrischen Einheit.	95
Tab. 10: Vergleich der <i>rmsd</i> -Werte der Trypsin-Varianten (Kette C), Eglin C-Mutanten-L45K (Kette D) und den Komplexstrukturen (Ketten CD) untereinander.	96
Tab. 11: Kontaktflächen und abgeschätzte Wechselwirkungsenergien für die vier untersuchten Komplexe.	106
Tab. 12: Kontaktflächen und abgeschätzte Wechselwirkungsenergien für die Modellkomplexe von nativem Trypsin und der katalytischen Domäne von Faktor Xa mit der Eglin C-Mutante-L45K.	107
Tab. 13: Apparente Schmelztemperaturen der vier untersuchten Varianten ermittelt mit der Methode DSC.	116
Tab. 14: Tabellarische Auflistung der thermodynamischen Parameter der Bindung von inaktivem bovines Trypsin bzw. der vier ausgewählten katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten an trypsin-spezifisches Eglin C.	121
Tab. 15: Kurzzusammenfassung der mittels verschiedener Methoden erhaltenen Ergebnisse.	133
Tab. A1: Übersicht über die ausgewählten Trypsin-Variant-Strukturen mit niedermolekularen Inhibitoren.	146

Tab. A2: Wasserstoffbrückenbindungen in den vier untersuchten Proteinkomplexen. 147

Tab. A3: Salzbrücken in den vier untersuchten Proteinkomplexen. 148

Abkürzungen

Å	Ångström, 10^{-10} m
APS	Ammoniumpersulphat
bTA	bovines Trypsin-Ala
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPI	<i>diffraction component precision index</i>
DTT	Dithiothreitol
E	Eglin C-Mutante-L45K
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Gla	γ -Carboxyglutamat
Gua-HCl	Guanidiniumhydrochlorid
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immunschwäche-Virus, <i>human immuno-deficiency virus</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
LB-Medium	<i>Lysogeny-broth-Medium</i>
MES	2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MWCO	<i>Molecular Weight Cut Off</i>
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-tri-Essigsäure
OD ₆₀₀	Optische Dichte (600 nm)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol

PDB	<i>Protein Data Bank</i>
SBTI	Soja-Bohnen-Trypsin-Inhibitor
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>sticks</i>	Stäbchenmodell­darstellung der Struktur
<i>rms</i>	<i>root mean square</i>
<i>rpm</i>	<i>revolutions per minute</i>
TA	<i>Triple-Ala</i>
TGA	<i>Triple-Glu-Ala</i>
TPA	<i>Triple-Phe-Ala</i>
TGPA	<i>Triple-Glu-Phe-Ala</i>
tPA	<i>tissue type</i> -Plasminogen-Aktivator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

1.1 Protein-Protein-Wechselwirkungen

Unter molekularer Erkennung versteht man das Phänomen, dass zwei (oder mehr) Moleküle miteinander wechselwirken. Sie spielt eine wichtige Rolle in der modernen supramolekularen Chemie, aber auch ganz speziell in der Biochemie, der Pharmakologie und der Medizin (Salwinski *et al.*, 2004; Fuentes *et al.*, 2009). So beruhen quasi sämtliche Prozesse in der Biochemie, angefangen von Transportvorgängen über Enzymkatalyse und Signalübertragungsketten bis hin zur Wirkungsweise des Immunsystems auf Wechselwirkungen zwischen Molekülen. Die Voraussetzung für eine Wechselwirkung zweier Moleküle miteinander, ist, dass ihre dreidimensionalen Strukturen zueinander komplementär sind. Das wiederum bedeutet, dass einerseits die Formen der Oberflächen zueinander passen müssen (siehe Schlüssel-Schloß-Prinzip), andererseits aber auch, dass beide Partner in der Lage sein müssen, spezifische Wechselwirkungen zueinander auszubilden. Dafür ist es erforderlich, dass geeignete funktionelle chemische Gruppen auf beiden Seiten so angeordnet sind, dass sie im Zustand der Wechselwirkung einander gegenüber stehen. Je mehr dieser Gruppen in Wechselwirkungen involviert sind, desto spezifischer wird die gesamte Wechselwirkung zwischen den beteiligten Partnern. Unter den Kräften, die dabei auftreten können, versteht man im Allgemeinen nicht-kovalente Wechselwirkungen, zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen, Salzbrücken, Metall-Ligand-Wechselwirkungen, Van der Waals-Wechselwirkungen und hydrophobe Wechselwirkungen. Das Studium und die Analyse dieser nicht-kovalenten Wechselwirkungen stellt eine der zentralen Herausforderungen der aktuellen biochemisch-biologisch-medizinischen Forschung dar. Im Zentrum des Interesses stehen hierbei insbesondere Wechselwirkungen von Proteinen mit anderen Proteinen und Nukleinsäuren, aber auch mit Peptiden oder kleinen Molekülen. Häufig ist es ein gestörter oder ein fehlerhafter Erkennungsprozess, der die Ursache schwerer Krankheiten darstellt. Da wie bereits eingangs erwähnt, die dreidimensionale Anordnung der Atome bzw. der funktionellen Gruppen der beteiligten Partner die Selektivität und Spezifität der Wechselwirkung beeinflusst, ist es zum Studium und zur Analyse dieser Wechselwirkung unabdingbar, dreidimensionale Strukturinformation in atomarer Auflösung zur Verfügung zu haben.

1.2 Schlüssel-Schloß-Prinzip, induzierter Fit und konformationelle Selektion

Wie bereits erwähnt, müssen die Oberflächen der wechselwirkenden Partner zueinander komplementär sein, um eine effektive Wechselwirkung zu ermöglichen. Sind die Oberflächen bereits in den nicht-wechselwirkenden Molekülen so ausgebildet wie sie es auch im Komplex sind, spricht man vom Schlüssel-Schloß-Prinzip, da der eine Bindungspartner zum anderen Bindungspartner paßt, so wie ein Schlüssel in ein Schloß paßt. Kommt es im Verlauf der Bindung zu einer Konformationsänderung in einem der Bindungspartner oder in beiden, spricht man von induziertem Fit (*induced fit*) (Weickl & von Deuster, 2009). Dabei geht man davon aus, dass ein Bindungspartner durch die auszubildende Wechselwirkung in dem anderen Bindungspartner eine Strukturänderung hervorruft. Natürlich können die Strukturänderungen auch in beiden Bindungspartnern auftreten. Die dazu aufzuwendende Energie kann von der Gesamtbindungsenergie aufgebracht werden. Liegt ein Bindungspartner (oder beide) im Zustand vor der Bindung in einem Gleichgewicht mehrerer Konformationen vor, wobei nur eine dieser Konformationen bindungskompetent ist, kann es sein, dass diese eine Konformation durch den Vorgang der Bindung selektiert wird. Diesen Vorgang bezeichnet man als konformationelle Selektion (Weickl & von Deuster, 2009). Untersucht man die Kinetik und Thermodynamik dieser Bindungsprozesse, so können die drei Kategorien anhand ihrer kinetischen und thermodynamischen Parameter unterschieden werden.

1.3 Proteasen in Biologie und Medizin

Proteasen sind Enzyme, die Proteine und Peptide abbauen, indem sie die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung katalysieren (Abb. 1).



Abb. 1: Reaktionsschema der enzymatischen Hydrolyse von Peptidbindungen.

Je nachdem ob eine Protease eine Peptidkette in der Mitte spaltet oder vom Ende her angreift, bezeichnet man sie als Endopeptidase oder als Exopeptidase. Die bekanntesten Proteasen sind wohl das in der Magenschleimhaut gebildete Pepsin, das zur Verdauung von Nahrung dient, und die in der Bauchspeicheldrüse gebildeten Proteasen Trypsin und Chymotrypsin, die ebenfalls Teil des Verdauungsprozesses sind.

Neben der Unterteilung in Endo- und Exopeptidasen werden Proteasen auch noch nach der Architektur ihres aktiven Zentrums unterschieden. Serinproteasen (z.B. Trypsin, Subtilisin) weisen im aktiven Zentrum einen Serinrest auf, an dem die Spaltungsreaktion stattfindet, Metalloproteasen (z.B. Kollagenasen, Thermolysin) besitzen ein Zn^{2+} -Ion im aktiven Zentrum, Cysteinproteasen (z.B. Papain) sind durch das Vorhandensein eines Cysteins, Threonylproteasen (z.B. Proteasom) durch Threonin und saure Proteasen (z.B. Pepsin) durch das einer Asparaginsäure im aktiven Zentrum charakterisiert (Turk, 2006). Im Folgenden wird die Klasse der Serinproteasen näher beleuchtet.

1.4 Katalysemechanismus von Serinproteasen

Serinproteasen, welche in vielen Organismen vorkommen, bilden die größte Klasse der Säugetierproteasen. Charakteristisches Merkmal von Serinproteasen ist das Vorhandensein eines katalytisch essentiellen Serinrestes im aktiven Zentrum (Owen & Campbell, 1999). Zusammen mit den Aminosäuren Histidin und Asparaginsäure bildet das Serin die katalytische Triade der Serinproteasen (Abb. 2), die für die enzymatische Hydrolyse von Peptidbindungen verantwortlich ist. Hinsichtlich der Identität ihrer katalytisch aktiven Aminosäuren lassen sich Serinproteasen in Chymotrypsin-ähnlich und Subtilisin-ähnlich unterteilen. Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen sind gekennzeichnet durch die Aminosäurereihenfolge His57-Asp102-Ser195. Vertreter dieser Familie sind beispielsweise die Verdauungsenzyme Trypsin, Chymotrypsin und Elastase sowie die Blutgerinnungsfaktoren z.B. Plasmin, Thrombin und Faktor Xa. Zu der Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen gehören beispielsweise Subtilisin, Proteinase K und Furin. Charakterisiert wird die sogenannte Subtilisin-Familie durch das Motiv Asp32-His64-Ser221 der katalytischen Triade. Nach Substratbindung erfolgt im ersten Schritt der Hydrolyse von Peptidbindungen die Ausbildung eines kovalenten Enzym-Substrat-Komplexes. Im Falle von Trypsin erfolgt die Ausbildung dieses Komplexes am Ser195¹⁾. Ser195 überträgt sein Proton auf His57¹⁾ und greift die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung nukleophil an (1). Dabei wird ein kovalentes, tetraedrisches Intermediat gebildet (2). Die Carboxylsäureseitenkette von Asp102¹⁾ stabilisiert dabei den protonierten Imidazoliumring des His57. Im Anschluss kommt es zur Bildung des Acyl-Enzym-Intermediates (3) und zur Abspaltung eines Amins, wobei His57 das von Ser195 erhaltene Proton an die freigewordene Aminogruppe abgibt. Im zweiten Schritt der Reaktion wird ein Proton von einem Wassermolekül auf His57 übertragen und das Hydroxidion greift den Acyl-Enzym-Komplex nukleophil an (4). Es kommt zur

Ausbildung einer tetraedrischen Übergangsstruktur (5) und anschließend zur Abspaltung des Produkts. Nach der Katalyse ist das Enzym für die nächste Runde verfügbar.

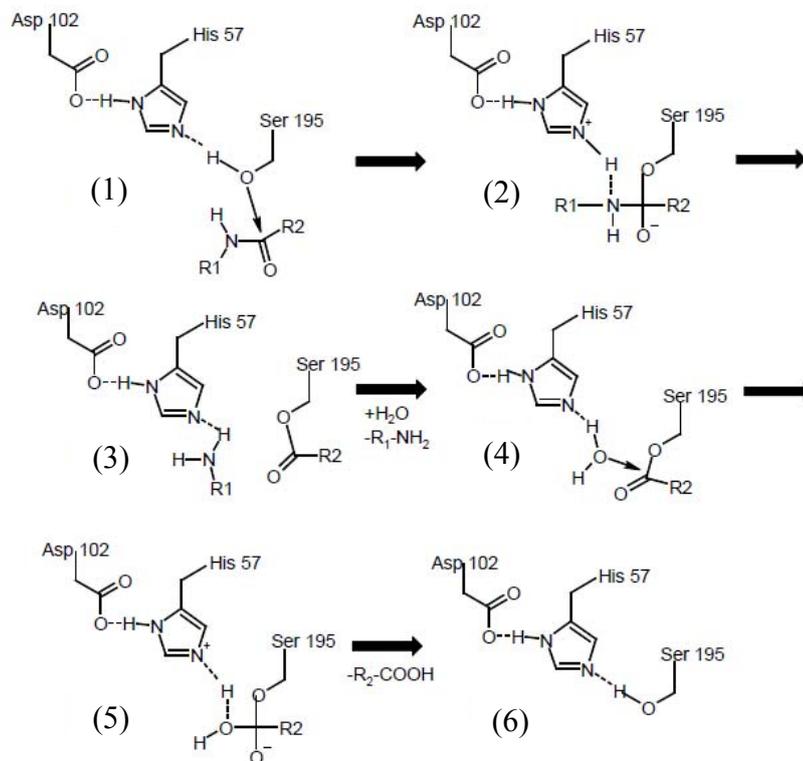


Abb. 2: Katalysemechanismus von Serinproteasen (Quelle: Dullweber, 2000). ¹⁾ Die Nummerierung der Aminosäurereste erfolgt nach der strukturellen Homologie zu Chymotrypsin (Shotton & Hartley, 1970).

1.5 Substratspezifitäten von Serinproteasen

Unterschiedliche Proteasen weisen in der Regel unterschiedliche Spezifitäten auf. Darunter versteht man, welche Aminosäuresequenz ein zu spaltendes Peptid aufweisen muss, um von einer bestimmten Protease gespalten zu werden. So spaltet Trypsin zum Beispiel immer auf der C-terminalen Seite von Arginin oder Lysin, während Chymotrypsin nur nach großen hydrophoben Aminosäuren wie Phenylalanin spaltet. Üblicherweise wird die Substratspezifität einer Protease nach dem Schema von Schechter und Berger beschrieben (Schechter & Berger, 1967). Die Nomenklatur zur Beschreibung der Interaktion zwischen Substraten bzw. Inhibitoren und Proteasen ist in Abb. 3 schematisch dargestellt. Das Peptidsubstrat wird dabei mit dem Buchstaben **P** bezeichnet. Bindetaschen am Enzym, die sich an der Substratspaltung mechanistisch wie selektiv beteiligen, erhalten den Buchstaben **S**. Ausgehend vom Ort der Spaltung werden die zu spaltenden peptidischen N-terminalen Aminosäurereste mit **P1**, **P2**, **P3** usw. und die C-

terminalen mit **P1'**, **P2'**, **P3'** usw. bezeichnet. Entsprechend werden alle Bindetaschen, die mit den N-terminalen Resten des Substrates interagieren, mit **S1**, **S2**, **S3** ... bezeichnet, bzw., die mit den C-terminalen Resten wechselwirkenden Taschen mit **S1'**, **S2'**, **S3'** ... benannt.

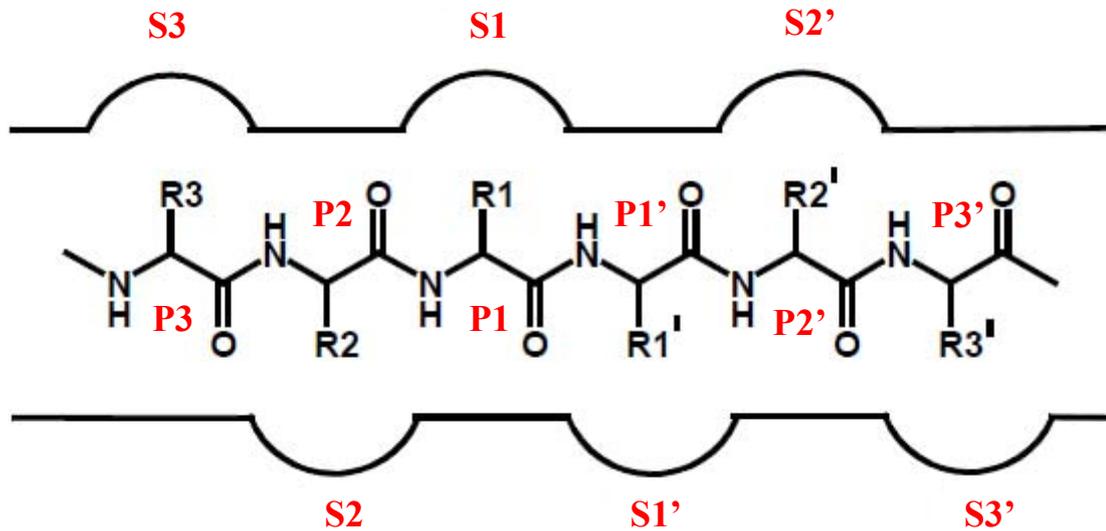


Abb. 3: Konvention zur Nomenklatur von Substrat - und Bindetaschen in Proteasen (modifiziert nach Dullweber, 2000).

Proteasen haben vielfältige Bedeutungen in der Biologie, der Industrie und der Medizin. Als Beispiele seien hier nur die Wirkungen der Proteasen in der Blutgerinnung, die Verwendung von Proteasen in der Waschmittelproduktion und die Entwicklung von Proteasehemmern in der AIDS-Therapie angeführt.

1.6 Trypsin

Trypsin (EC 3.4.21.4) gehört wie Faktor Xa zur Klasse der Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen. Es wird im Dünndarm unter der Wirkung des Enzyms Enteropeptidase aus seiner in der Bauchspeicheldrüse sezernierten Vorstufe, dem Trypsinogen, freigesetzt. Strukturell gesehen ist es ein globuläres Protein mit einer molekularen Masse von 24500 Da.

Seit der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Trypsins aus dem Rind (*Bos taurus*) mittels Röntgenkristallstrukturanalyse im Jahr 1974 (Huber *et al.*, 1974; Stroud *et al.*, 1974), hat sich Trypsin zum Prototyp für Serinproteasen entwickelt, die in der S1-Bindetasche eine Spezifität für Arginin aufweisen (Barrett *et al.*, 1989). Diese Proteasen

zeigen untereinander eine hoch konservierte Tertiärstruktur, wobei gleichzeitig die Primärstrukturen stark voneinander abweichen können. Die Nummerierung der Aminosäuren von Serinproteasen orientiert sich entsprechend einer Konvention an der homologen Protease Chymotrypsin (Shotton & Hartley, 1970). Trotz einer Primärstrukturidentität von weniger als 50 %, haben Trypsin und Chymotrypsin eine nahezu identische Raumstruktur. Charakteristisches Merkmal der Chymotrypsin-ähnlichen Proteasen ist eine identische Position der katalytischen Triade (Asp102- His57- Ser195). In Trypsin findet sich zudem noch das spezifitätsbestimmende Asp189 am Boden der S1-Tasche, wie in Abb. 4 veranschaulicht.

Wie auch bei anderen Vertretern dieser Klasse, setzt sich die Tertiärstruktur von Trypsin vorwiegend aus β -Faltblättern zusammen und besteht aus 2 Domänen, wobei jede Domäne eine β -Fass-Struktur ausbildet. Zwischen den Domänen befindet sich das aktive Zentrum mit der katalytischen Triade und der Substratbindetasche. Jedes „Fass“ ist aus 6 antiparallel laufenden β -Strängen aufgebaut und 4 der 5 verbindenden Schleifen sind so genannte Haarnadelschleifen (Müller, 2003). Neben den dominierenden β -Faltblattstrukturen kommen in der Tertiärstruktur des Trypsins aus zwei α -Helizes vor, eine so genannte intermediäre und eine lange C-terminale (Reyda *et al.*, 2003). Des Weiteren wird die dreidimensionale Struktur des Trypsins durch sechs konservierte Disulfidbrücken (Cys22-Cys157, Cys42-Cys58, Cys128-Cys232, Cys136-Cys201, Cys168-Cys182 und Cys191-Cys220) stabilisiert (Abb. 4).

Das Verdauungsenzym spaltet Peptide und Proteine optimal im schwach alkalischen Medium (pH 7-9) nach Lysin -und Argininresten. Für seine Aktivität und strukturelle Stabilität benötigt Trypsin eine Kalziumionenkonzentration von 10-20 mM (Corey *et al.* 1992). Das Ca^{2+} -Ion in Trypsin ist oktaedrisch koordiniert, wobei die OE1-Atome von Glu70 und Glu80, die Carbonylsauerstoffatome von Asn72 und Val75 und zwei Wassermoleküle (Bode *et al.*, 1975) als Ca^{2+} -Liganden fungieren.

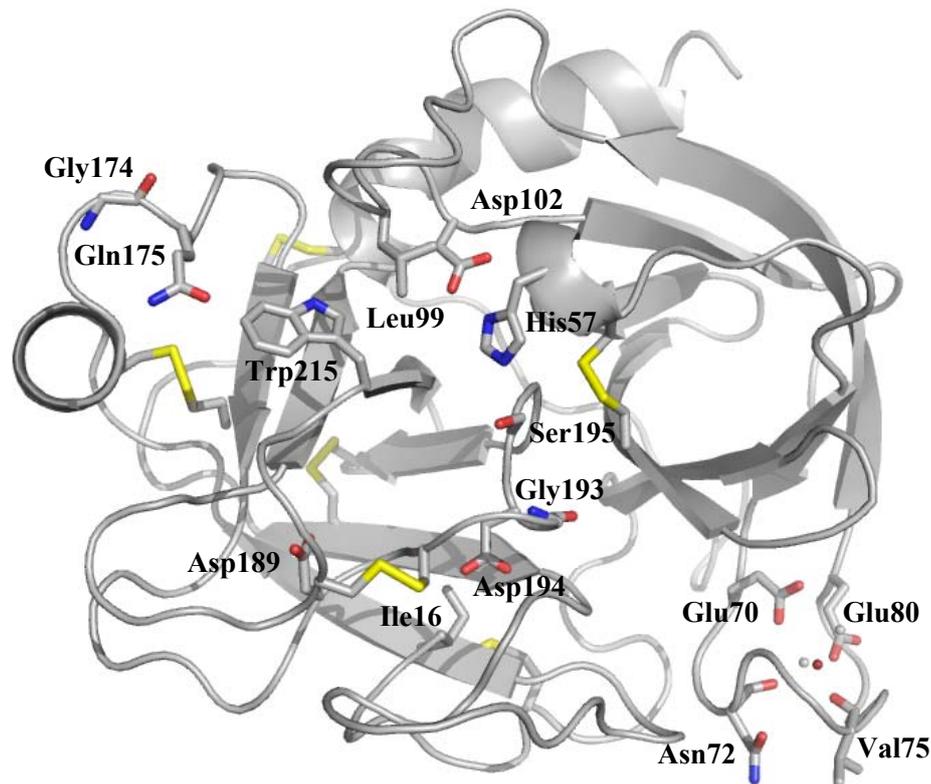


Abb. 4: Ausschnitt des aktiven Zentrums von bovinem Trypsin. Ausgewählte Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt: Die Reste Ser195, His57 und Asp102 bilden die katalytische Triade. Gly193 und Asp194 formen die so genannte Oxyaniontasche. Des Weiteren interagieren Asp194 und das N-terminale Ile16 über Van der Waals-Wechselwirkungen miteinander. Asp189 ist Teil der S1-Bindetasche und wechselwirkt mit dem P1-Rest des Substrates. Die hydrophobe S3/4-Bindetasche besteht aus den Resten Leu99, Gln175 und Trp215. Zusätzlich ist die oktaedrische Koordinierung des Ca^{2+} -Ions (rote Kugel) dargestellt. Die 6 Disulfidbrücken sind gelb markiert. PDB-Eintrag: 1MTS (Stubbs *et al.*, 1995).

1.7 Blutgerinnung

Die Blutgerinnung (Blutstillung, Stypsis, Hämostase) ist ein Prozess, der dafür sorgt, dass das Blutzirkulationssystem nach Verletzungen wieder instand gesetzt wird, und der Organismus somit nicht verblutet. Durch das Gerinnen des Blutes wird die Wunde erst einmal verstopft und die Voraussetzung dafür geschaffen, dass die Wunde heilen kann (Davie *et al.*, 1991). Da eine Verletzung des Blutzirkulationssystems im Prinzip lebensbedrohend ist, muß im Falle einer Verletzung die Blutgerinnung unmittelbar einsetzen. Allerdings muß auch dafür gesorgt werden, dass sie lokal beschränkt bleibt und dass nach erfolgreichem Verstopfen der Wunde keine weitere Gerinnung erfolgt. Aus diesem Grund muß der Prozeß der Blutgerinnung sehr gut kontrolliert und reguliert werden.

An der Blutgerinnung sind Blutplättchen (Thrombozyten) als auch im Blutplasma vorhandene Gerinnungsfaktoren beteiligt (Abb. 5). Die Thrombozyten sorgen dafür, dass durch das Verkleben der Blutplättchen ein relativ loser Verschluss um die Wunde gelegt wird. Durch die Gerinnung oder Koagulation der im Plasma vorhandenen Gerinnungsfaktoren wird dieser Verschluss stabilisiert, so dass die Wundheilung beginnen kann. Der Verschluss wird durch die Präzipitation und die Vernetzung von Fibrin (FIa), einem im Plasma vorhandenen Protein verdichtet.

Die Gesamtzahl der im Blutplasma vorhandenen Gerinnungsfaktoren und deren Wirkung werden als Blutgerinnungskaskade bezeichnet, die in Abb. 5 schematisch dargestellt ist.

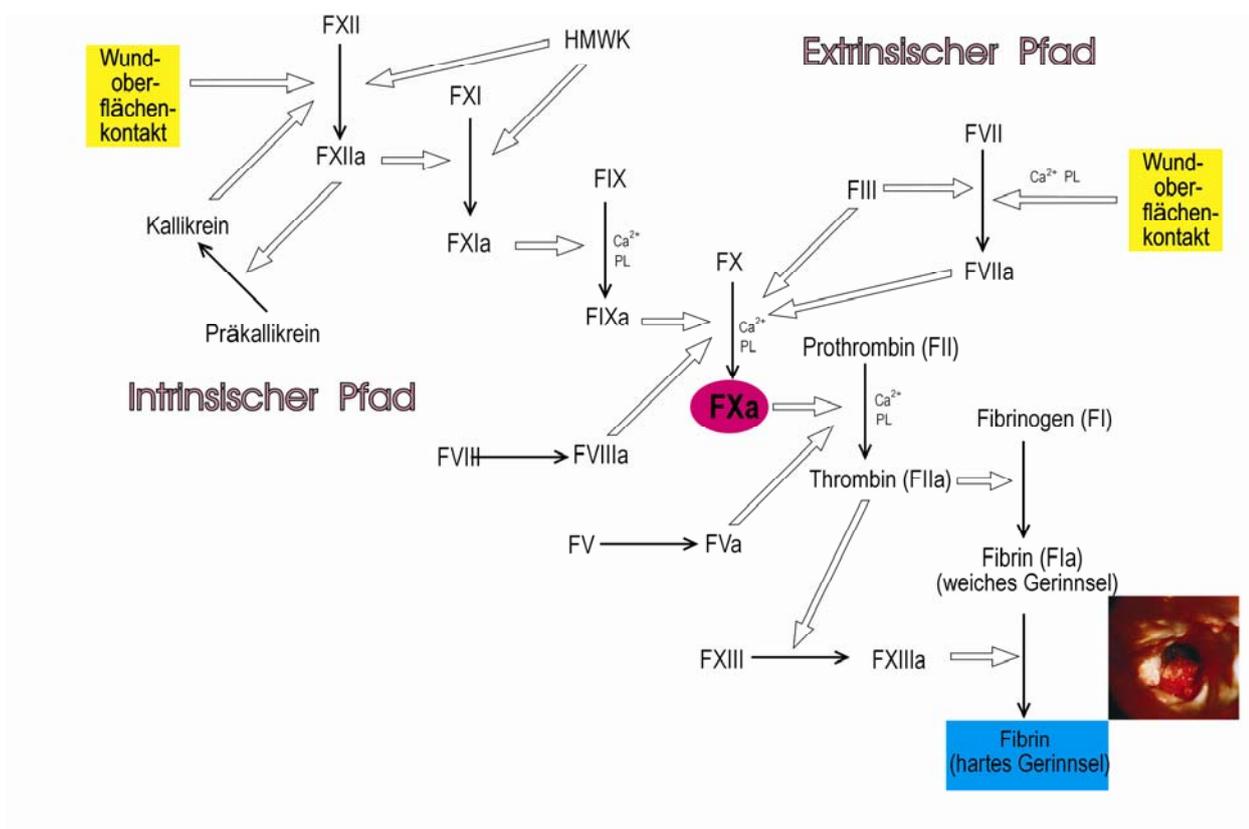


Abb. 5: Vereinfachtes Schema der Blutgerinnungskaskade. Die Aktivierung des Faktor Xa ist aufgrund der zentralen Bedeutung violett unterlegt.

Das Blutgerinnungssystem besteht aus den Gerinnungsfaktoren I, II, III, V, VII, VIII, IX, X, XI XII und FXIII sowie Präkallikrein, hochmolekularem Kininogen (HMWK), Ca²⁺-Ionen und Phospholipiden aus Thrombozyten.

Kommen Thrombozyten in Kontakt mit negativ geladenen, nicht physiologischen Oberflächen, wie zum Beispiel Glas, wird der intrinsische Weg der Blutgerinnungskaskade eingeleitet. In dieser sogenannten Kontaktphase wird Präkallikrein zu Kallikrein umgewandelt, welches wiederum Faktor XII aktiviert (siehe Abb. 5). Faktor XII zirkuliert, wie alle anderen Faktoren der Blutgerinnungskaskade auch, als inaktive Form im Blutplasma. Durch die Aktivierung wird die aktive Form, Faktor XIIa, gebildet. Mit zunehmender Freisetzung von Faktor XII kommt es zur Aktivierung des Faktors XI, der zu einer Freisetzung von Bradykinin, einem Vasodilatator führt. Bradykinin entsteht aus dem hochmolekularen Kininogen (HMWK). HMWK hat unterschiedliche Funktionen, u.a. bindet es sich an negativ geladene Oberflächen und haftet damit Präkallikrein und Faktor XI an diese.

Im nächsten Schritt aktiviert Faktor XIa in Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen den Faktor IX. Faktor IX ist ein Proenzym, das Vitamin-K abhängige, γ -Carboxyglutamat (Gla)-Reste enthält. Die Serinproteaseaktivität kommt nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen an diese Gla-Reste zum Tragen. Mehrere der Serinproteasen der Blutgerinnungskaskade (Faktoren II, VII, IX und X) enthalten derartige Vitamin-K-abhängige Gla-Reste. Faktor IXa spaltet Faktor X und führt zur Aktivierung von Faktor Xa.

Voraussetzung für die Freisetzung von Faktor Xa aus dem Proenzym Faktor X, auch *Stuart-Prower-Faktor* genannt (Copper *et al.*, 1997), ist die Bildung eines sogenannten Tenasekomplexes aus dem Faktor IXa, dessen Kofaktor Faktor VIIIa, sowie Ca^{2+} -Ionen an der Oberfläche aktivierter Blutplättchen.

Intrinsischer und extrinsischer Weg laufen auf der Stufe der Faktor X-Aktivierung zusammen. Der extrinsische Weg der Blutgerinnungskaskade wird durch die Freisetzung von Gewebefaktor (*Tissue factor*, Faktor III) nach einer Verletzung gestartet. Der Gewebefaktor ist ein Kofaktor in der Faktor VIIa-katalysierten Aktivierung des Faktors X.

Faktor Xa konvertiert im Weiteren Thrombin (Faktor IIa), welches Fibrinogen (Faktor I) zu Fibrin (Faktor Ia) spaltet (Davey & Luscher, 1968). Fibrinmonomere fallen aus und werden von Faktor XIIIa, einer hochspezifischen Transglutaminase, zwischen den Glutamin - und Lysin-Seitenketten kreuzvernetzt, und die Wunde schließt sich. Die Aktivierung von Thrombin erfolgt an der Oberfläche von aktivierten Plättchen und erfordert die Bildung des Prothrombinasekomplexes. Dieser Komplex ist aus Faktor Va, Faktor Xa,

Prothrombin, sowie Thrombozytenphospholipiden, Phosphaditylinositol, Phosphatidylserin und Ca^{2+} -Ionen zusammengesetzt.

Durch die Anordnung der Blutgerinnung in Form einer Kaskade, wird zum einen eine enorme Verstärkung des Signals erreicht und zum anderen ergeben sich in diesem System viele Möglichkeiten zur Regulierung und zur Abschaltung.

Als wichtige Inhibitoren der Blutgerinnung sind Antithrombin III und Protein C hervorzuheben. Antithrombin III ist ein natürlicher, im Blutplasma vorkommender Inhibitor der Gerinnungsfaktoren IXa, Xa und XIIa (Rosenberg *et al.*, 2001). Die Aktivität von Antithrombin III wird durch die Anwesenheit von Heparin um das 1000-fache gesteigert. Protein C, das Vitamin-K-abhängige Proenzym des aktivierten Protein C (APC), drosselt zum einen die Thrombinbildung durch Inaktivierung der Faktoren Va und VIIIa und zum anderen steigert es die fibrinolytische Aktivität (Dolan *et al.*, 1989).

1.8 Faktor Xa

Aufgrund seiner zentralen Funktion in der Blutgerinnungskaskade ist Faktor Xa (EC 3.4.21.6) ein pharmazeutisch interessantes *target*. Aus therapeutischen Gründen ist es wichtig an dieser Schnittstelle zwischen dem intrinsischen und dem extrinsischen Weg in der Blutgerinnungskaskade einzugreifen. Inhibitoren von Faktor Xa sind daher von erheblichem medizinischem Interesse.

Faktor Xa ist eine Vitamin K-abhängige Serinprotease mit einem Molekulargewicht von 45300 Da. Als inaktives Zymogen, das in der Leber synthetisiert wird (Furie & Furie, 1988) und eine biologische Halbwertszeit von 32-43 Stunden hat, besteht Faktor X aus zwei Polypeptidketten, die über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind. Die leichte Kette besteht aus 139 Aminosäuren und enthält eine Gla (γ -Carboxyglutamat)-Domäne, an die sich zwei EGF-ähnliche (*epidermal growth factor*) Domänen anschließen. Die schwere Kette ist aus insgesamt 303 Aminosäuren aufgebaut. Davon entfallen 52 Aminosäuren auf die Aktivierungssequenz und 254 Aminosäuren auf die eigentliche katalytische Domäne. Die katalytische Domäne der schweren Kette steht über eine Disulfidbrücke in Kontakt mit der C-terminalen EGF-ähnlichen Domäne. Abb. 6 zeigt vereinfacht den schematischen Aufbau von humanem Faktor X.

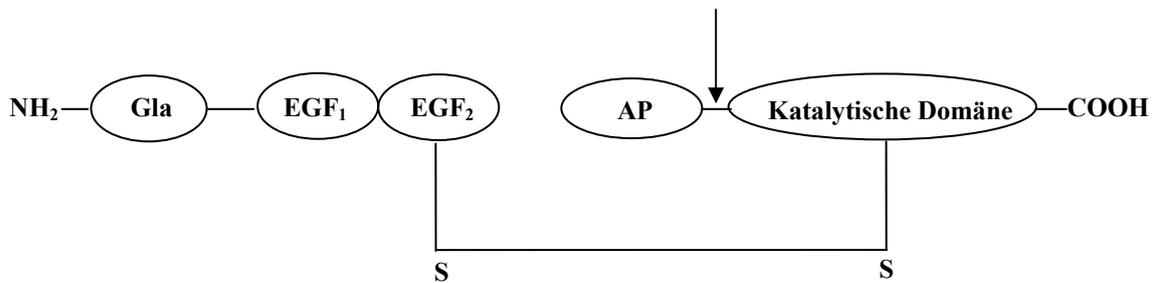


Abb. 6: Vereinfachte schematische Darstellung der Topologie von Faktor X. Die Domänenstruktur setzt sich zusammen aus einer Gla-Domäne, zwei EGF-Domänen, einer Aktivierungssequenz (AP) und einer Katalytischen Domäne, die die katalytische Triade trägt. Der Pfeil gibt an, wo die proteolytische Aktivierung des Zymogens erfolgt.

Die Aktivierung von Faktor Xa erfolgt in Anwesenheit von Kalziumionen durch Proteolyse der Aktivierungssequenz auf der Oberfläche von Phospholipidmembranen. Das entstandene Faktor Xa bindet mit seiner Gla-Domäne in Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen an negativ geladene Phospholipidmembranen und leitet zusammen mit Faktor Va, Ca²⁺-Ionen als Prothrombinase-Komplex die Aktivierung von Prothrombin zu Thrombin ein (Rosing *et al.*, 1980).

In vitro kann Faktor X durch eine Protease aus *Russel's viper venom* (Schlangengift) zu Faktor Xa aktiviert werden, ohne dass Phospholipide, Ca²⁺ oder andere Komponenten benötigt werden (Barthels & von Depka, 2003).

Die dreidimensionale Struktur von humanem Faktor Xa wurde Mitte der 90er-Jahre röntgenkristallographisch von Padmanabhan *et al.* aufgeklärt (Padmanabhan *et al.* 1993, Brandstetter *et al.* 1996). Die Struktur der katalytischen Domäne von Faktor Xa ist was die Faltung und die Topologie betrifft sehr ähnlich zu der von Trypsin, Chymotrypsin und anderen Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen (Abb. 7).

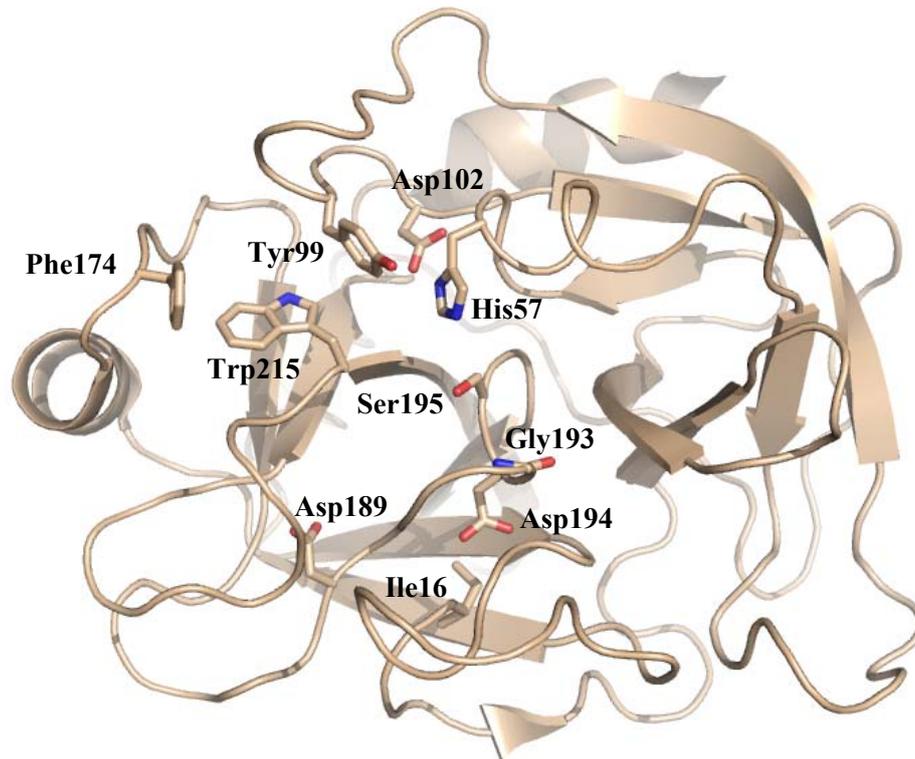


Abb. 7: Ausschnitt des aktiven Zentrums von Faktor Xa. Ausgewählte Reste sind als *sticks* dargestellt. Die katalytische Triade wird von Ser195, His57 und Asp102 gebildet. Gly193 und Asp194 formen die so genannte Oxyanionentasche. Des Weiteren bilden Asp194 und das N-terminale Ile16 Van der Waals-Wechselwirkungen aus. Asp189 ist Teil der S1-Bindetasche und wechselwirkt mit dem P1-Rest des Substrates. Die hydrophobe S3/4-Bindetasche besteht aus den Resten Tyr99, Phe174 und Trp215. PDB-Eintrag: 1FJS (Adler *et al.*, 2000).

1.9 Struktur der Bindetaschen von Trypsin und Faktor Xa

Die beiden Serinproteasen Trypsin und Faktor Xa unterscheiden sich signifikant in einigen Bereichen innerhalb ihrer Aminosäuresequenz. Infolgedessen entstehen unterschiedliche räumliche Strukturen im aktiven Zentrum und an der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche der Enzyme. Daraus resultieren unterschiedliche Substratspezifitäten, die den Proteasen ihre Selektivität vermitteln. Beim Design von synthetischen Inhibitoren werden diese strukturellen Unterschiede gezielt adressiert, um die jeweilige Protease möglichst selektiv zu inhibieren.

In beiden Proteasen ist die S1-Tasche tief ausgebildet und Arginin- und Lysinspezifisch, was sich in der selektiven Erkennung des Strukturelements widerspiegelt (Abb. 8). Das geschieht, indem sich zwischen der Carboxylgruppe des konservierten Asp189, am Boden der S1-Tasche, und der Guanidino- bzw. Aminogruppe des Arginin- bzw. Lysinsubstrats eine begrabene Salzbrücke ausbildet. An die S1-Tasche schließt sich die so genannte

Oxyanionentasche an, die während der Katalyse das geladene Sauerstoffion im tetraedischen Intermediat stabilisiert.

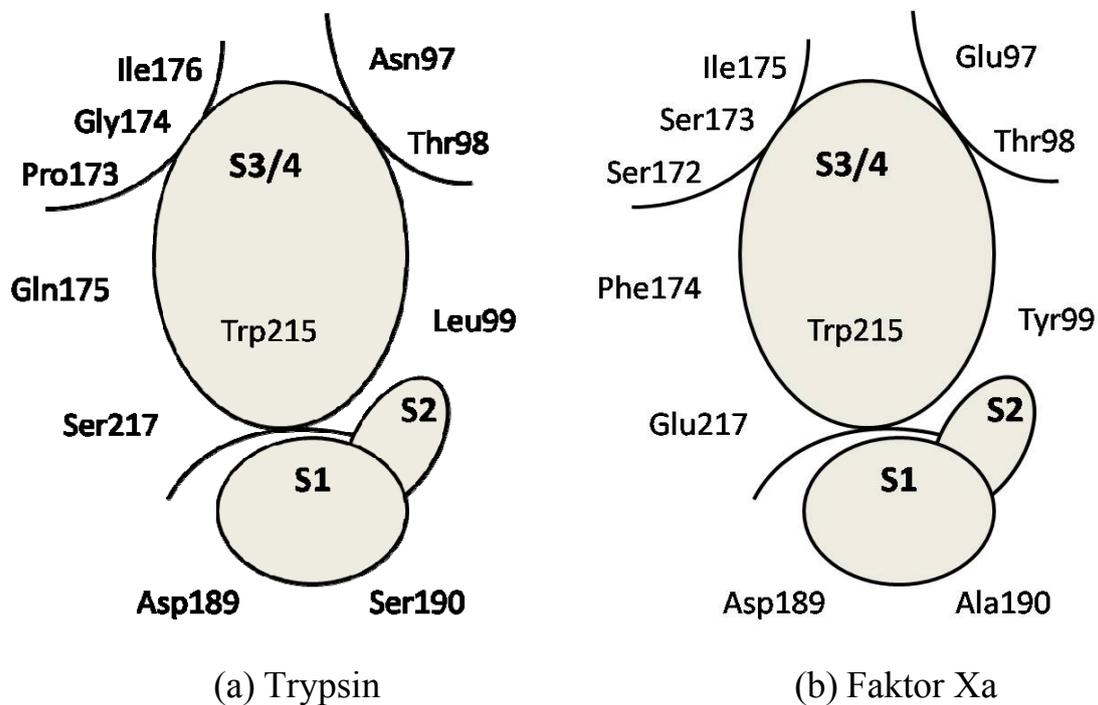


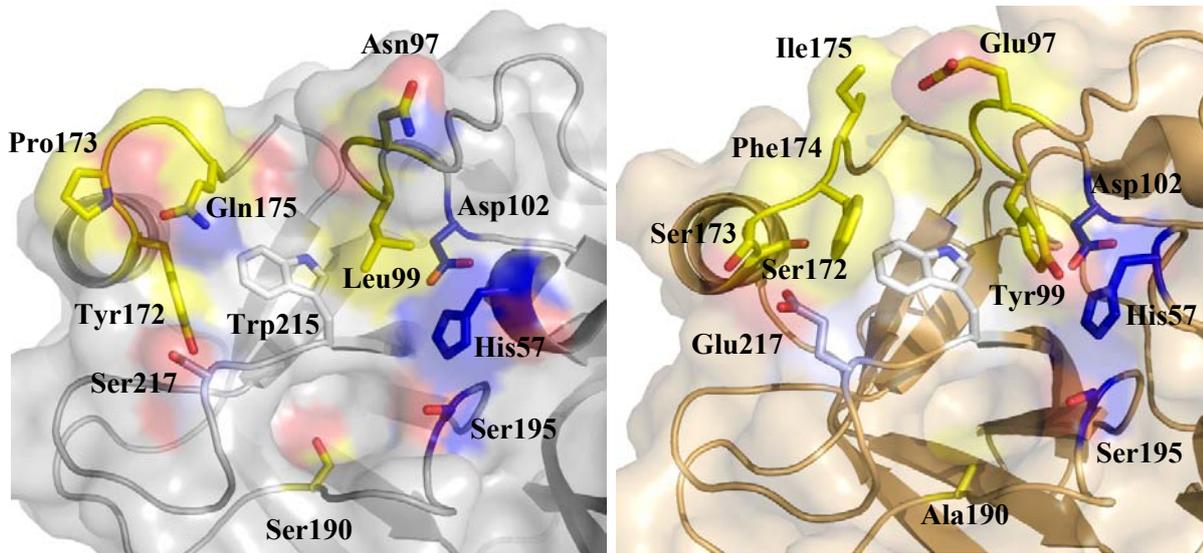
Abb. 8: Schematische Darstellung der Bindetaschen von bovinem Trypsin (a) und humanem Faktor Xa (b). Die Bindetaschen bestehen aus der S1-Substratspezifitätstasche, S2-Tasche und der hydrophoben S3/4-Aromatenbindetasche, die für die Interaktion mit Inhibitoren bedeutend ist.

Trypsin und Faktor Xa unterscheiden sich in ihrer primären Substratspezifität unter anderem aufgrund des Aminosäurerestes in Position 190. Trypsin besitzt in dieser Position ein Serin, was in einer ausgeprägten Substratspezifität für Arginin und Lysin in P1 resultiert. Im Faktor Xa ist das Serin gegen ein Alanin ausgetauscht, wodurch die Ausbildung einer durch ein Wassermolekül vermittelten Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette des Ser190 und der ϵ -Aminogruppe des Lysins unterbunden wird. Infolge dessen wird die Spezifität von Lysin zu Arginin in Position P1 des Substrates verschoben (Sichler *et al.*, 2002).

Neben den Unterschieden in der primären Spezifitätstasche (S1) unterscheiden sich Trypsin und Faktor Xa zusätzlich in ihren S2- und S3/4-Bindetaschen.

Die ausgeprägte S2-S4-Substratspezifität des Faktor Xa wird durch die 99er-Schleife (Aminosäuren 97-99) bestimmt. Der Zugang zur S2-Tasche für große Substrate wird durch die Seitenketten von Tyr99 behindert, wodurch Glyzin als kleinste Aminosäure in P2 bevorzugt wird. Die Seitenkette des Tyr99 in der S2-Bindetasche des Faktor Xa bildet

mit den Seitenketten von Trp215 und Phe174 der S3/4-Tasche eine große hydrophobe Oberfläche, die besonders von hydrophoben Resten in P4 (Isoleuzin oder Alanin) besetzt wird. Trypsin hingegen zeigt wegen unterschiedlicher Aminosäurereste in den Bereichen der 99er- und 175er-Schleife eine breite Substratspezifität für P2-P4. Die lösungsmittel-zugänglichen Oberflächen von Trypsin und Faktor Xa werden in Abb. 9 veranschaulicht.



(a) Trypsin

(b) Faktor Xa

Abb. 9: Oberflächendarstellung der katalytischen Domänen von bovinem Trypsin (a) und humanem Faktor Xa (b). Trypsin ist in grau dargestellt und Faktor Xa in beige. Die drei Schleifen der Ligandenbindetasche sind gelb hervorgehoben. Trp215, das Teil der hydrophoben S3/4-Aromatenbindetasche ist, ist weiß markiert. Die Aminosäure in Position 217 (Serin in Trypsin und Glutaminsäure in Faktor Xa) ist in hellblau angezeigt und die katalytische Triade in dunkelblau. PDB-Einträge: 1K1I (Dullweber *et al.*, 2001); 1FJS (Adler *et al.*, 2000).

Unterschiede in der Primärstruktur beider Proteasen spiegeln sich nicht nur in verschiedenen Substratspezifitäten, sondern auch in unterschiedlichen Spezifitäten für Inhibitoren wider. Während das Verdauungsenzym Trypsin relativ unspezifisch schneidet und von mehreren niedermolekularen Inhibitoren, zum Beispiel Benzamidin (IUPAC-Nomenklatur: Amidinobenzol) adressiert werden kann, ist Faktor Xa als zentraler Bestandteil der Blutgerinnungskaskade eine sehr spezifische Protease. Faktor Xa hingegen wird u.a. durch die sogenannte Zeneca-Verbindung (IUPAC-Nomenklatur: [4-(6-Chloronaphthalin-2-sulfonyl)-piperazin-1-yl]-(3,4,5,6-tetrahydro-2H-1,4'-bipyridinyl-4-yl)-methanon), welche in die hydrophobe aromatische Box (S3/4) bindet, spezifisch inhibiert (Stubbs *et al.*, 2002; Rauh *et al.*, 2003) (Abb. 10).

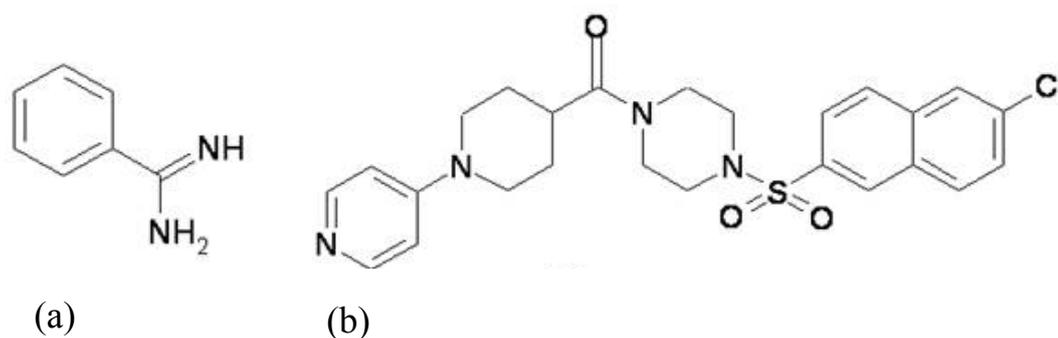


Abb. 10: Strukturformeln zweier niedermolekularer Inhibitoren. Benzamidin (a) ist, im Gegensatz zu der so genannten Zeneca-Verbindung (b), ein sehr unspezifischer niedermolekularer Inhibitor für Faktor Xa.

1.10 Faktor Xa-ähnliche Trypsin-Varianten als Modellsystem für Faktor Xa

Wegen seiner eingangs beschriebenen zentralen Rolle in der Blutgerinnung, ist Faktor Xa ein außerordentlich wichtiges *target* in der pharmazeutischen Industrie. Die Entwicklung von niedermolekularen Antithrombotika als Faktor Xa-Inhibitoren stellt eine bedeutende Aufgabe mit einem enormen wirtschaftlichen Potential dar.

Durch seine bekannten Kristallisationseigenschaften, das Vorhandensein zahlreicher Röntgenkristallstrukturdaten, seiner guten Handhabung und der strukturellen Ähnlichkeit mit dem Blutgerinnungsfaktor bietet sich Trypsin als Modellsystem für die Analyse der Ligandenbindetasche von Faktor Xa geradezu an. So wurde angesichts der schwierigen Handhabung und schlechten Kristallisationseigenschaften von humanem Faktor Xa (Brandstetter *et al.*, 1996; Kamata *et al.*, 1998; Maignan *et al.*, 2000; Adler *et al.*, 2000; Nar *et al.*, 2001) auf die homologe Serinprotease Trypsin zur strukturellen Untersuchung der Bindungsmodi von Faktor Xa-Inhibitoren zurückgegriffen (Stubbs *et al.*, 1995; 2002; Renatus *et al.*, 1998).

Mit dem Wissen um die Funktionen der Ligandenbindetaschen, konnten Bindungsmodi für eine Vielzahl von niedermolekularen Faktor Xa-Inhibitoren abgeleitet werden (Renatus *et al.*, 1998). Ein charakteristisches Bindungsmerkmal eines spezifischen Faktor Xa-Inhibitors ist zum einen die Wechselwirkung seiner basischen Amidinfunktion mit der S1-Substratspezifitätstasche und zum anderen die Interaktion seiner hydrophoben Reste mit der S3/4-Aromatenbindetasche. Inhibitoren mit basischen Seitenketten hingegen, wechselwirken mit den Carbonylsauerstoffatomen der Aminosäuren Thr98 und Ile176

und dem OE1-Atom von Glu67, die eine so genannte elektrophile Bindetaschen formen (Renatus *et al.*, 1998).

Um die Spezifität von Trypsin an diejenige von Faktor Xa anzugleichen wurde die Ligandenbindetasche des Faktors Xa, bestehend aus der 99er -, 175er - und 190er-Schleife, (Abb. 11), schrittweise mittels zielgerichteter Mutagenese auf das verwandte bovine Trypsin übertragen (Rauh *et al.*, 2002). Die auf diese Weise gewonnenen, sogenannten *Triple*-Trypsin-Varianten, besitzen veränderte Substrat - und Inhibitor-spezifitäten.

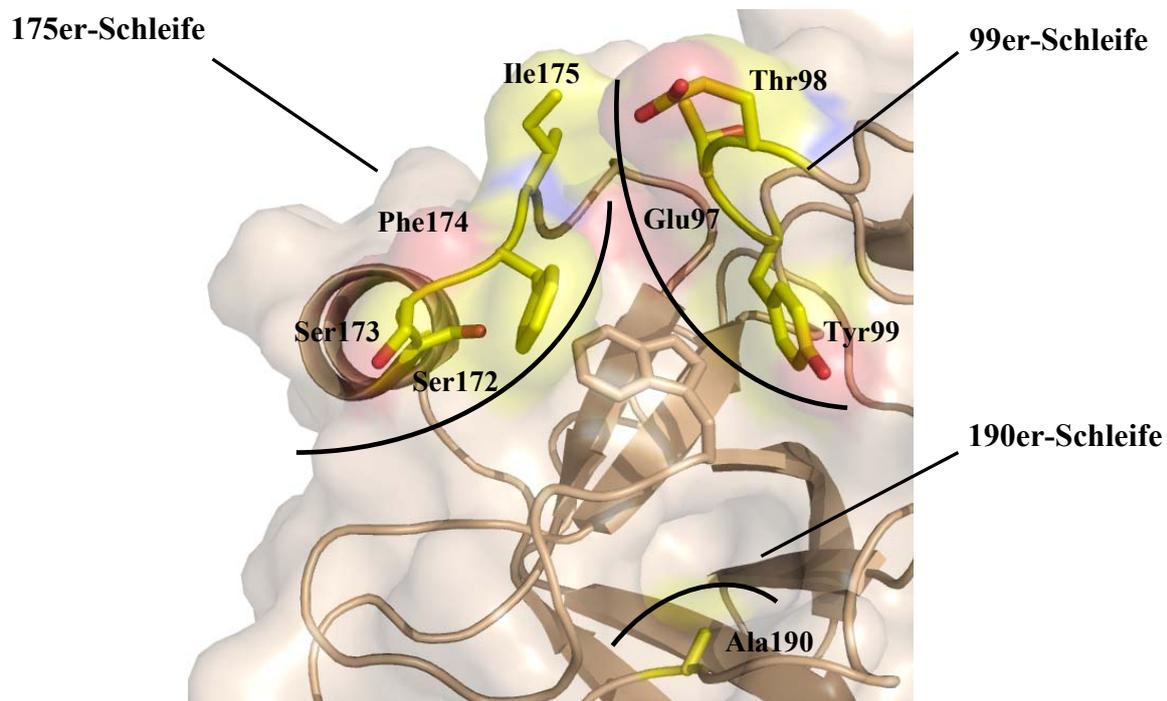


Abb. 11: Ligandenbindetasche von humanem Faktor Xa. Die drei Schleifen der Faktor Xa Ligandenbindetasche sind gelb markiert. Die dazugehörigen Aminosäuren sind als *sticks* dargestellt. Die 99er-Schleife besteht aus Glu97-Thr98-Tyr99, die 175er-Schleife aus Ser172-Ser173-Phe174-Ile175 und die 190er-Schleife aus Ala190. Die drei Schleifen flankieren die S1-, S2-, S3/4- Bindetaschen der Protease. PDB-Eintrag: 1FJS (Adler *et al.*, 2000).

Alle generierten Trypsin-Varianten, die ein Alanin in Position 190 der S1-Substratspezifitätstasche tragen, zeigten analog zum Faktor Xa eine hohe Spezifität für Arginin in P1, wohingegen die Selektivität für Lysin an dieser Stelle stark reduziert ist. Des Weiteren wurde durch die Einführung der 99er-Schleife in Trypsin die Zugänglichkeit zur S2-Bindetasche erschwert. Die sperrige Seitenkette vom Tyr99 erlaubt nur Substraten mit einem Glyzinrest in P2 den Zugang. Mit dem Einbringen der Aminosäuren Phe174 und Tyr99 sollte die S3/4-Aromatenbindetasche einen

hydrophoberen Charakter bekommen (Stubbs *et al.*, 1995; Brandstetter *et al.*, 1996). Trypsin-Varianten, die die 175er-Schleife des Faktors Xa enthielten, zeigten allerdings veränderte Ligandenbindungseigenschaften, die mit einer unerwarteten strukturellen Flexibilität zu erklären war (Reyda *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2004). Abb. 12 veranschaulicht die strukturelle Flexibilität der 175er-Schleife, die in der so genannten *Triple-Glu* Trypsin-Variante, in Abhängigkeit von dem Bindungsmodus des niedermolekularen Inhibitors, beobachtet worden ist (siehe auch Tab. A1 im Anhang).

175er-Schleife

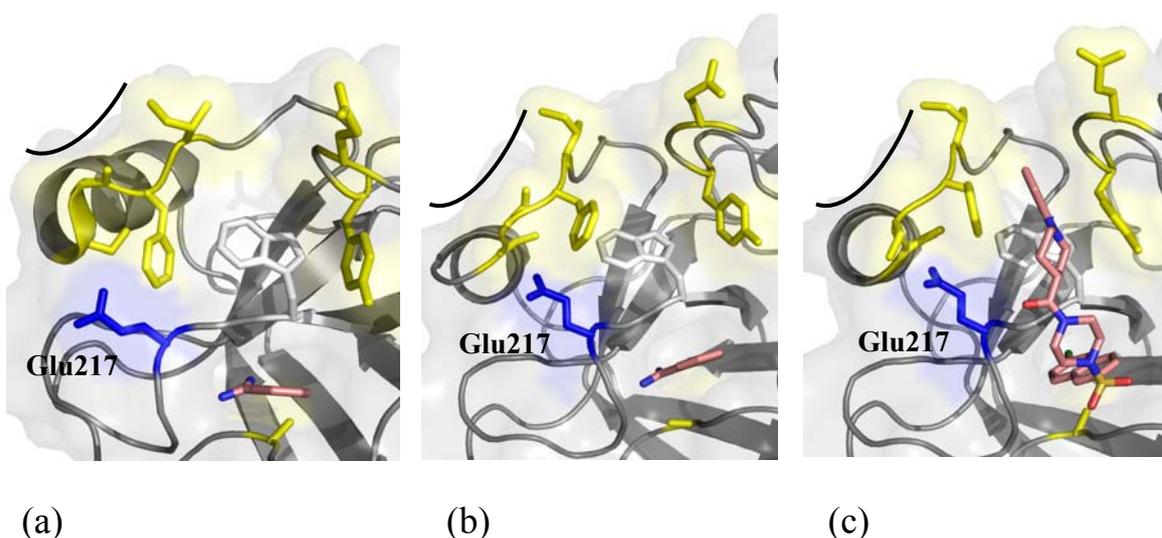


Abb. 12: Oberflächendarstellungen der flexiblen Schleife der *Triple-Glu* Trypsin-Variante im Komplex mit Benzamidin (a), (b) und einem Faktor Xa-spezifischen Inhibitor, der Zeneca-Verbindung (c). In gelb sind die drei ausgetauschten Schleifen der Faktor Xa Ligandenbindetasche als *stick*-Modell hervorgehoben (Beschriftung siehe Abb. 11). Zusätzlich zu den drei Schleifen besitzt die Variante in Position 217 einen Glutaminsäurerest, der blau eingefärbt ist. Die strukturelle Flexibilität in der intermediären Helix wird durch die Bindung der niedermolekularen Inhibitoren induziert: Die 175er-Schleife ist zum einen in der *down*-Konformation zu finden (a), zum anderen in der *super-up*-Konformation (b) und in der Faktor Xa-ähnlichen *up*-Konformation (c) (Rauh *et al.*, 2004).

1.11 Ausgewählte Faktor Xa-ähnliche Trypsin-Varianten

Im Rahmen der angefertigten Arbeit wurden vier Trypsin-Varianten ausgewählt, die im Folgenden erläutert werden. Zur Generierung dieser Trypsin-Varianten wurden die in Tab. 1 aufgeführten Aminosäureaustausche durch zielgerichtete Mutagenese vorgenommen.

Tab. 1: Unterschiede in der Primärstruktur zwischen den ausgewählten Trypsin-Varianten.

Protein	Primärstruktur				
	99er-Schleife: 97+99	175er-Schleife: 172+173+174+175	190er-Schleife: 190	As 217	As 227
Trypsin	Asn+Leu	Tyr+Pro+Gly+Gln	Ser	Ser	Val
<i>Triple</i>	Glu+Tyr	Ser+Ser+Phe+Ile	Ala	Ser	Val
<i>Triple-Glu</i>	Glu+Tyr	Ser+Ser+Phe+Ile	Ala	Glu	Val
<i>Triple-Phe</i>	Glu+Tyr	Ser+Ser+Phe+Ile	Ala	Ser	Phe
<i>Triple-Glu-Phe</i>	Glu+Tyr	Ser+Ser+Phe+Ile	Ala	Glu	Phe
Faktor Xa	Glu+Tyr	Ser+Ser+Phe+Ile	Ala	Glu	Ile

Die Tabelle gibt die Aminosäuren der Ligandenbindetasche (99er-, 175er- und 190er-Schleife) des Faktors Xa an, die auf bovines Trypsin durch Mutagenese übertragen worden sind. Zur Veranschaulichung sind in grün die Aminosäuren des Trypsins hervorgehoben und in rot die des Faktors Xa. Die Gemeinsamkeit der vier ausgewählten Trypsin-Varianten, *Triple* (T), *Triple-Glu* (TG), *Triple-Phe* (TP) und *Triple-Glu-Phe* (TGP), ist, dass sie die vollständige Ligandenbindetasche des Faktors Xa erhalten haben. Sie unterscheiden sich aber durch zusätzlich eingeführte Punktmutationen in den Positionen 217 und 227: Die *Triple* Variante verfügt in beiden Positionen über die Reste des Trypsins. In der *Triple-Glu* Variante ist an Position 217 das Ser gegen Glu, die in Faktor Xa an dieser Stelle vorkommt, ausgetauscht. Die *Triple-Phe* Variante hat in Position 227 ein Phe. Im *Triple-Glu-Phe* Trypsin sind das Glu an Stelle 217 und Phe an Position 227 vereint. Das Phe227 stammt aus der homologen Serinprotease Thrombin (Rydell *et al.*, 1994) und ist deswegen blau markiert. Faktor Xa trägt an dieser Stelle ein Ile. In den Arbeiten von Rauh *et al.*, (2003) und (2004) wurden die Varianten *Triple* und *Triple-Glu* designed; die Plasmide der Varianten *Triple-Phe* und *Triple-Glu-Phe* beruhen auf der Arbeit von Tziridis, 2008.

Allen vier ausgewählten *Triple* Trypsin-Varianten ist gemein, dass sie die vollständige Ligandenbindetasche des humanen Faktors Xa, d.h. die 99er-, 175er- und 190er-Schleife, enthalten (Abb. 13). Sie unterscheiden sich jedoch in ihren Aminosäureresten an den Positionen 217 und 227 im Protein. In Abb. 13 ist unter anderem die Lage dieser Reste am Beispiel der *Triple* Trypsin-Variante graphisch dargestellt.

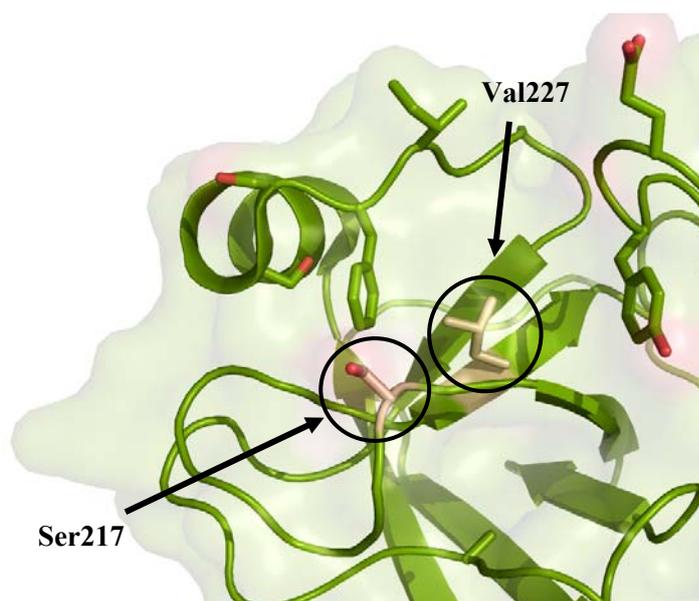


Abb. 13: Strukturelle Darstellung der *Triple* Variante. Die Oberfläche des Proteins ist in hellgrün angezeigt. Die vollständige Ligandenbindetasche, mit der 99er-, 175er- und 190er-Schleife, ist als stick-Modell in grün dargestellt. Die Aminosäurereste 217 und 227 sind als beige sticks hervorgehoben. In bovinem Trypsin befindet sich an Position 217 ein Serin und an Position 227 ein Valin. Faktor Xa hingegen besitzt Glu217 und Ile227.

Die durch zielgerichtete Mutagenese herbeigeführten Änderungen in der Primärstruktur des bovinen Trypsins führten zu einer strukturellen Veränderung der Konformation der Bindetasche, die durch Zusatz von niedermolekularen Liganden während der Kristallisationsexperimente induziert und mittels Röntgenkristallstrukturanalyse analysiert werden konnte und zum anderen zu Abweichungen im enzymkinetischen Verhalten (Rauh *et al.*, 2003; 2004; Tziridis, 2008). Ziel der Mutationsstudien war es, eine Trypsin-Variante zu kreieren, die der Zielstruktur, dem Faktor Xa, strukturell und thermodynamisch am ähnlichsten ist und für Ligandenbindungsstudien genutzt werden kann. Im folgenden Abschnitt werden die in der vorliegenden Arbeit ausgewählten Trypsin-Varianten hinsichtlich ihrer strukturellen und enzymkinetischen Besonderheiten vorgestellt:

Triple Trypsin. Die *Triple* Trypsin-Variante enthält alle drei Schleifen der Ligandenbindetasche des Faktors Xa. Der Austausch der 175er-Schleife des bovinen Trypsins - Tyr172, Pro173, Gly174, Gln175 - gegen die des Faktors Xa - Ser172, Ser173, Phe174, Ile175 - resultierte in einer signifikanten Konformationsänderung im Bereich der sogenannten intermediären Helix, die Teil der 175er-Schleife ist - Cys168 bis Cys182 - im Vergleich zur Faktor Xa-Zielstruktur.

In dem Blutgerinnungsfaktor ist dieser Bereich immer in der sogenannten *up*-Konformation und in der *Triple* Variante in allen beobachteten Kristallstrukturen in der sogenannten *down*-Konformation (siehe Abb. 12). Diese Konformationsunterschiede beziehen sich auf die Anordnung der Seitenkette des Phe174 in der 175-Schleife. In der *down*-Anordnung ist die S3/4-Aromatenbindetasche nicht vollständig ausgebildet und der Phenylrest ist im Inneren des Proteins verborgen und wird durch die Aminosäurereste Ile176, Trp215, Pro225, Val227 und die Disulfidbrücke Cys168-Cys182 stabilisiert. Infolgedessen ist die intermediäre Helix - Asp165 bis Ala170 - teilweise aufgewunden und im Durchmesser verbreitert (Rauh *et al.*, 2004). In der Faktor Xa-ähnlichen *up*-Konformation hingegen zeigt die 175er-Schleife mit dem Phe174 zur lösungsmittelzugänglichen Oberfläche. Die S3/4-Tasche und die intermediäre Helix sind vollständig ausgebildet.

Enzymkinetische Daten, die unter anderem für einen Faktor Xa-spezifischen Inhibitor, der Zeneca-Verbindung, mittels Aktivitätstest bestimmt worden sind (Rauh *et al.*, 2004), zeigen eine 1000-fach schwächere Inhibierung der *Triple* Variante ($K_i = 2 \mu\text{M}$) durch die

Zeneca-Verbindung als für Faktor Xa ($K_i = 2 \text{ nM}$). Die Zeneca-Verbindung ist somit ein schlechter Inhibitor für die *Triple* Variante.

***Triple-Glu* Trypsin.** Zusätzlich zu den drei Schleifen der Ligandenbindetasche des Faktors Xa, ist im *Triple-Glu* Trypsin das Ser217 gegen Glutaminsäure des Faktors Xa ausgetauscht. Mittels Röntgenkristallstrukturanalyse wurde festgestellt, dass die *Triple-Glu* Variante hinsichtlich der Orientierung der 175er-Schleife flexibel ist. In Gegenwart des niedermolekularen Inhibitors Benzamidin konnten, in Abhängigkeit von der Kristallpackung, sowohl *down* - als auch *super-up*-Konformationen beobachtet werden (siehe Abb. 12). Darüber hinaus wurde in sogenannten *Soaking*-Experimenten, in denen die Zeneca-Verbindung in die *Triple-Glu* Proteinkristalle hineindiffundiert wurde, beobachtet, dass die Bindung dieses Inhibitors den Übergang von der *super-up*- zur *up*-Konformation induzierte. Die drei möglichen Konformationen der 175er-Schleife sind in Abb. 12 illustriert.

Begünstigt wird die *up*-Konformation in der *Triple-Glu* Variante und im Faktor Xa durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Carboxylgruppe vom Glu217 und dem Sauerstoffatom des Ser172 (Rauh *et al.*, 2004). In der *super-up*-Konformation ist das Phe174 mit der 175er-Schleife noch weiter zur Oberfläche des Enzyms geneigt und die schleifennahe Windung die intermediäre Helix dadurch leicht aufgedreht.

Trotz dieser beobachteten Proteinflexibilität wird die *Triple-Glu* Variante in Enzymaktivitätstests vergleichsweise stärker durch die Zeneca-Verbindung inhibiert ($K_i = 650 \text{ nM}$) als die *Triple* Variante.

***Triple-Phe* Trypsin.** Diese Trypsin-Variante wurde erzeugt, um durch sterische Hinderung die *down*-Konformation der intermediären Helix zugunsten der Faktor Xa-ähnlichen *up*-Konformation zu destabilisieren. Das *Triple-Phe* Trypsin enthält daher, neben der vollständigen Ligandenbindetasche des Faktors Xa, ein Phenylalanin in Position 227, was in der homologen Serinprotease Thrombin an dieser Stelle zu finden ist (Abb. 13). Röntgenkristallstrukturanalysen zeigten, dass in Anwesenheit kleiner niedermolekularer Inhibitoren, wie Benzamidin, keine definierte Elektronendichte für die Aminosäuren 168 bis 182 in der Kristallstruktur dieser Variante zu finden ist. Das ist ein Hinweis für die hohe Flexibilität der 175er-Schleife. In Anwesenheit größerer

niedermolekularer Inhibitoren jedoch, die die S3/4-Aromatenbindetasche besetzen, ist die Elektronendichte für den Bereich gut definiert und in der Faktor Xa-ähnlichen *up*-Konformation.

Die Inhibitorbindungskonstante, der K_i -Wert, der Zeneca-Verbindung für die *Triple-Phe* Variante beträgt 900 nM (Tziridis, 2008).

***Triple-Glu-Phe* Trypsin.** Die *Triple-Glu-Phe* Variante nimmt eine Sonderstellung in der Reihe der ausgewählten Trypsin-Varianten ein. In ihrer Primärstruktur vereint sie die drei Schleifen der Ligandenbindetasche und die Glu217 des Faktors Xa und das Phe227 des Thrombins. Durch die Gesamtheit dieser Mutationen wurde in allen Kristallstrukturen dieser Variante, unabhängig von der Größe des niedermolekularen Inhibitors, eine Faktor Xa-ähnliche *up*-Konformation der intermediären Helix beobachtet.

Zu der konformationellen Ähnlichkeit mit Faktor Xa, kommt ein Faktor Xa-ähnlicher K_i -Wert für die Zeneca-Verbindung von 5 nM. Die Zeneca-Verbindung ist somit ein genauso potenter Inhibitor für *Triple-Glu-Phe* Trypsin wie für Faktor Xa (Tziridis, 2008).

Obwohl sich die vier Trypsin-Varianten untereinander nur in ein bzw. zwei Punktmutationen unterscheiden, zeigen sie zum einen große strukturelle Abweichungen bezüglich der Konformation ihrer intermediären Helix mit der 175er-Schleife und zum anderen stark unterschiedliche Inhibitorbindekonstanten für einen potenter Faktor Xa Inhibitor, der Zeneca-Verbindung (Tab. 2). Während die *Triple* Variante nur in der Faktor *down*-Anordnung vorkommt und die schlechteste Inhibierung durch die Zeneca-Verbindung zeigt, stellen die *Triple-Glu* - und *Triple-Phe* Varianten mit ihren flexiblen 175er-Schleifen und den mittleren Inhibitorbindungskonstanten Zwischenstufen dar. Mit der Generierung der *Triple-Glu-Phe* Variante ist es gelungen, ein Enzym zu erzeugen, das hinsichtlich seiner strukturellen und enzymatischen Eigenschaften der Faktor Xa-Zielstruktur am Ähnlichsten kommt. Die vier *Triple* Trypsin-Varianten repräsentieren so den Übergang von „Trypsin-ähnlich“ zu „Faktor Xa-ähnlich“.

Tab. 2: Vergleich der Konformation der 175er-Schleifen und der Inhibitorbindekonstanten für einen potenten Faktor Xa-Inhibitor, der Zeneca-Verbindung, zwischen den ausgewählten Trypsin-Varianten.

Protein	Konformation der 175er-Schleife	K _i [nM] für Zeneca-Verbindung
bovines Trypsin	-	13000
<i>Triple</i>	<i>down</i>	2000
<i>Triple-Glu</i>	<i>down, up, super-up</i>	650
<i>Triple-Phe</i>	flexibel	900
<i>Triple-Glu-Phe</i>	<i>up</i>	5
humaner Faktor Xa	<i>up</i>	2

1.12 Makromolekulare Inhibitoren von Serinproteasen

Proteininhibitoren von Serinproteasen nutzen nicht nur einen bestimmten Mechanismus um die zugehörige Protease zu inhibieren. Es wird nach drei Mechanismen zur Inhibierung unterschieden (Otlewski *et al.*, 1999).

Die größte Gruppe machen die Standardinhibitoren aus. Serinproteasen der Chymotrypsin- und Subtilisin-Familie und ihre Standardinhibitoren gehören zu der meist untersuchten Gruppe von Protein-Protein-Komplexen. Diese sogenannten kanonischen Proteaseinhibitoren sind weit verbreitet in allen Gruppen von Organismen und verfügen über Proteine von 27 bis zu 200 Aminosäureresten. Die Proteaseinhibitoren können in 18 Familien unterschieden werden (Laskowski & Qasim, 2000). Repräsentative Beispiele dieser verschiedenen Klassen zeichnen sich durch ihre unterschiedliche Faltung aus, während die Hauptkettenkonformation ihrer P3-P3'-Segmente (nach der Nomenklatur von Schechter & Berger, 1967) ähnlich ist (Apostoluk & Otlewski, 1998; Otlewski *et al.*, 1999; Bode & Huber, 2000). Die sogenannte Standardkonformation ist durch eine konvex-geformte Schleife gekennzeichnet, die die konkave aktive Seite des dazugehörigen Enzyms erkennt. Der mittlere Teil dieser exponierten Schleife enthält eine solvenszugängliche, leicht spaltbare P1-P1'-Peptidbindung, die in substratähnlicher Weise die Protease erkennt. Durch die Tertiärstruktur des Inhibitors werden die P1 und P1'-Reste in räumlicher Nähe fixiert, so dass die Inhibierung letztlich darauf beruht, dass die P1-P1'-Spaltung reversibel ist. Stabilisiert wird diese Konformation hauptsächlich durch zahlreiche Van der Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Dabei bilden ungefähr 10-12 Aminosäuren auf der Inhibitorseite und 20-25 Reste auf der Proteasenseite eine zwischenmolekulare Kontaktfläche von ungefähr

600-900 Å². Die Berührungsfläche ist vorwiegend hydrophob und im zentralen Teil frei von Wassermolekülen. Nichtsdestotrotz werden auch elektrostatische Interaktionen und Wasserstoffbrückenbindungen an der Kontaktfläche von Protease und Inhibitor ausgebildet. In diesem Zusammenhang wichtig ist ein kurzes antiparalleles β -Faltblatt, das durch die Hauptketten-Hauptketten-Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Resten P3 und P1 und dem 214-216-Segment der Protease, geformt wird.

Die Interaktion zwischen dem disulfid-stabilisierten Inhibitor BPTI und der Protease Trypsin gilt als Paradigma für die Inhibierung von Serinproteasen nach dem Standardmechanismus (Bode & Huber, 1992).

Nicht-kanonische Proteaseinhibitoren stellen die zweite Klasse von Proteaseinhibitoren dar. Ein charakteristisches Merkmal dieser Inhibitorfamilie ist, dass sie mit ihrem N-terminalen Segment an die aktive Seite des Enzyms binden. Aufgrund der ausgedehnten Kontaktfläche bilden diese Inhibitoren sehr stabile Komplexe mit Serinproteasen. Ein klassisches Beispiel dafür ist die Erkennung von Thrombin durch Hirudin (Grütter *et al.*, 1990; Rydel *et al.*, 1991) bzw. durch Ornithodorin (Van de Locht *et al.*, 1996).

Zu der dritten Klasse von Serinproteaseinhibitoren gehören die Serpine. Serpine sind Eindomänenproteine, die aus bis zu 400 Aminosäuren bestehen und oftmals im Plasma in verschiedenen Glykosilierungszuständen vorkommen (Travis & Salvesen, 1983; Potempa *et al.*, 1994). Sie interagieren mit der Protease über eine exponierte, schlecht definierte Schleife in substratähnlicher Weise, wie es auch für kanonische Inhibitoren typisch ist. Im Fall der Serpine aber führt die Spaltung der P1-P1'-Peptidbindung zu einer dramatischen Struktur- und Stabilitätsänderung (Engh *et al.*, 1995, Whisstock *et al.*, 1998). Auf der Stufe der Acyl-Enzym-Intermediat-Bildung dringt die reaktive Schleife der Serpine, RCL genannt, in ein zentral-gelegenes β -Faltblatt der Protease ein, wodurch die Protease um 70 Å gedreht wird (Huntington *et al.*, 2000). Die daraus resultierende Verzerrung des aktiven Zentrums der Protease führt zu deren irreversiblen Inaktivierung. Aus diesem Grund werden Serpine als Selbstmordinhibitoren bezeichnet. Im Gegensatz zu den Standardinhibitoren ist die reaktive Bindschleife der Serpine flexibel und kann verschiedene Konformationen einnehmen. Die Familie der Serpine ist die einzige Serinproteaseinhibitorfamilie für die Komplexbildungen mit Nicht-Serinproteasen, den Cysteinproteasen (Komiyama *et al.*, 1994) und Aspartatproteasen (Mathialagan & Hansen, 1996) nachgewiesen werden konnte.

1.13 Eglin C und trypsin-spezifisches Eglin C

Eglin C ist ein Proteaseinhibitor aus dem Blutegel *Hirudo medicinalis* (Seemüller *et al.*, 1977), der verschiedene Serinproteasen, beispielweise Chymotrypsin, Subtilisin, Elastase und Cathepsin G inhibiert (Seemüller *et al.*, 1980). Aufgrund seiner inhibitorischen Potenz den zwei letzten Proteasen gegenüber findet Eglin C Anwendung in der therapeutischen Behandlung von Entzündungsprozessen und Atemwegserkrankungen (Schnebli & Braun, 1986).

Die ersten Kristalle von Eglin C im Komplex mit Subtilisin Carlsberg wurden in den Jahren 1985/1986 beschrieben und röntgenkristallographisch aufgeklärt (McPhalen *et al.*, 1985, Bode *et al.*, 1986; Grütter *et al.*, 1985). Weitere röntgenkristallographische Arbeiten an Eglin C im Komplex mit Subtilisin wurden von Heinz *et al.*, (1990) durchgeführt. 1992 wurde die erste dreidimensionale Struktur von bovinem Chymotrypsin im Komplex mit Eglin C gelöst (Frigerio *et al.*, 1992).

Entsprechend der Klassifizierung von Laskowski & Kato, (1980), gehört Eglin C zu der Familie der *potato inhibitor I family of serine proteases*. Zu dieser Familie gehören beispielsweise auch zwei Proteinase B-Inhibitoren aus der Hefe (Maier *et al.*, 1979) und die Inhibitoren aus Gerstensamen U-1 und U-2 (Svendsen *et al.*, 1980; Jonassen & Svendsen, 1982 und CI-2 (McPhalen & James, 1987). Die allgemeine Besonderheit dieser Inhibitoren ist das Fehlen von Disulfidbrücken.

Eglin C besteht aus 70 Aminosäuren, die sich in eine charakteristische Struktur falten und ein verzerrtes, gemischtes paralleles und antiparalleles, vier-strängiges β -Faltblatt ausbilden, auf dessen einer Seite sich eine α -Helix (Reste 18-25) befindet und auf der anderen die geweitete, reaktive Proteasenbindeschleife (Reste 40-48), die für kanonische Inhibitoren, zu den Eglin C zählt, typisch ist. Die dreidimensionale Struktur von Eglin C ist in Abb. 14 dargestellt.

Die Proteasebindeschleife mit der zu spaltenden Peptidbindung zwischen Leu45 (P1) und Asp46 (P1') wird durch elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in ihrer gestreckten Konformation (Abb. 14) gehalten. Im Weiteren wird die dreidimensionale Struktur stabilisiert, indem Thr44 und Asp46, die beide in der Schleife lokalisiert sind, mit Arg51 und Arg53 auf dem zentralen Teil des Proteins und mit dem C-terminalen Gly70 und mehreren Wassermolekülen interagieren.

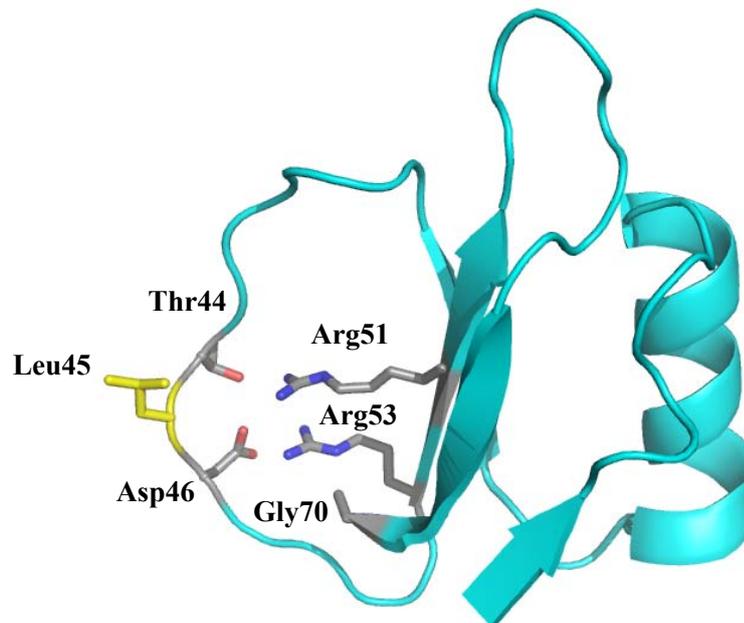


Abb. 14: Schematische Darstellung der dreidimensionalen Struktur von Eglin C. Die Sekundärstrukturelemente sind als *cartoon* dargestellt. Der P1-Rest Leu45 ist in der Abbildung gelb hervorgehoben. PDB-Eintrag: 1ACB (Frigerio *et al.*, 1992)

Diese ausschließlich nicht-kovalente Wechselwirkung ist in der Form nahezu einzigartig und wurde so nur noch in dem strukturell homologen Inhibitor CI-2 aus dem Gerstensamen beobachtet (McPhalen *et al.*, 1985).

Natürlich vorkommendes Eglin C weist an seiner P1-Position, der Aminosäure 45, ein Leuzin auf, was Eglin C zu einem potenten Inhibitor der Protease Chymotrypsin macht. Mutiert man Leu45 zu der Aminosäure Lysin verändert man die Spezifität von Eglin C von Chymotrypsin-inhibierend zu Trypsin-inhibierend. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit der Eglin C-Mutante-Leu45Lys gearbeitet.

1.14 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten weitergehende strukturelle und thermodynamische Informationen bezüglich der Dynamik der flexiblen 175er-Schleife der intermediären Helix in vier Trypsin-Varianten gewonnen werden und deren Einfluß auf Wechselwirkung mit makromolekularem Substrat analysiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Untersuchungen auf makromolekulare Interaktionen mit dem Proteaseinhibitor Eglin C ausgeweitet.

Auf struktureller Ebene sollten zum einen die dreidimensionalen Strukturen von vier ausgewählten Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten im Komplex mit der L45K-

Mutante von Eglin C bestimmt werden. Dazu mussten die entsprechenden Proteine in reiner Form hergestellt, die entsprechenden Komplexe gebildet und kristallisiert werden und Diffraktionsdaten der Komplexe zu hoher Auflösung gemessen werden. Zum anderen sollten für NMR-spektroskopische Analysen doppelt-markierte Trypsin-Varianten hergestellt werden.

In Ergänzung zu den strukturellen Analysen sollte die Thermodynamik der Komplexbildung mit Hilfe der Methode der Isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) studiert werden. Ziel war es, die aus ITC-Messungen erhaltenen thermodynamischen Parameter mit den Strukturdaten in Beziehung zu setzen. Die thermische Stabilität der ausgewählten Trypsin-Varianten allein sollte mittels Dynamischer Differenzkalorimetrie (DSC) untersucht werden.

Voraussetzung für die thermodynamischen und strukturellen Untersuchungen ist das Vorhandensein homogener Proteinpräparationen. Der Selbstverdau der aktiven Trypsin-Varianten stellt dabei ein großes Problem dieses Ansatzes dar. Um dem entgegenzuwirken, sollten katalytisch inaktive Trypsin-Varianten durch zielgerichtete Mutagenese generiert werden, die der Ausgangsschritt für die oben genannten Analysen sind.

2 Röntgenstrukturanalyse

Neben der mehrdimensionalen kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*, abgekürzt NMR) ist die Kristallstrukturanalyse oder Röntgenstrukturanalyse die einzige Methode, die dreidimensionale Strukturinformation von biologischen Makromolekülen in atomarer Auflösung liefert. Im Gegensatz zur Mikroskopie ist eine Röntgenstrukturanalyse allerdings eine indirekte Abbildungsmethode, d.h. sie liefert kein direktes Bild der Probe, sondern ein Streubild, aus dem dann die Struktur der Probe errechnet werden muss.

2.1 Allgemeines

2.1.1 Das physikalische Prinzip der Streuung von elektromagnetischer Strahlung an Materie

Wird eine Probe mit elektromagnetischer Strahlung bestrahlt, kommt es zu einer Wechselwirkung der Elektronen der Probe mit dem elektrischen Teil der Welle. Dabei werden die Elektronen der Probe in Schwingung versetzt, und zwar in einer Frequenz, die der Frequenz der einfallenden Strahlung entspricht. Als schwingende geladene Teilchen wirken die oszillierenden Elektronen dann wie Sender und geben Strahlung derselben Frequenz in alle Raumrichtungen ab. Diesen Vorgang nennt man *elastische Streuung* oder *Thomson-Streuung* oder *Streuung ohne Energieverlust*. Aus dem so erhaltenen Streumuster lässt sich im Prinzip Information über die Struktur der Probe gewinnen.

2.1.2 Auflösung

Um in einem Streuversuch Strukturinformation bis hin zu einer bestimmten Auflösung zu erlangen, muss elektromagnetische Strahlung verwendet werden, deren Wellenlänge der angestrebten Auflösung entspricht. Will man also einzelne Atome „sehen“, muss die für das Streuexperiment verwendete Wellenlänge im Bereich der Atomabstände liegen. Ein guter Richtwert für die Länge einer C-C-Einfachbindung liegt ungefähr bei 1.5 Å (1 Å = 100 pm = 10^{-10} m), d.h. die für einen Streuversuch, bei dem man atomare Auflösung erreichen möchte, zu verwendende Strahlung liegt im Röntgenbereich des elektromagnetischen Spektrums.

2.1.3 Warum verwendet man Kristalle?

Die von einem einzelnen Molekül verursachte Streuung von elektromagnetischer Strahlung ist sehr schwach und praktisch nicht messbar. Aus diesem Grund ist es notwendig, eine große Anzahl von Molekülen in der Probe zu haben. Für Proteinmoleküle erreicht man das, indem man konzentrierte Lösungen verwendet. Bestrahlt man eine hochkonzentrierte (z.B. 10 mg/ml) Proteinlösung mit Röntgenstrahlen, erhält man ein sogenanntes Kleinwinkelstremuster. Da die Moleküle in Lösung in allen möglichen Orientierungen vorliegen können, stellt das erhaltene Stremuster einen Mittelwert über alle möglichen Orientierungen dar. Die resultierende Streukurve ist eindimensional, d.h. die Werte für die gestreute Intensität hängen lediglich vom Streuwinkel und nicht von der Streurichtung ab. Aus einem solchen Muster lassen sich dann zwar Aussagen über die Gestalt der Moleküle bei niedriger Auflösung machen, aber keine Strukturdetails bei atomarer Auflösung erhalten. Eine andere Möglichkeit, eine hochkonzentrierte Probe herzustellen, ist die Kristallisation. Gelingt es, die zu untersuchenden Proteinmoleküle auf einem Kristallgitter anzuordnen, hat man 10^{12} - 10^{15} Moleküle in der Probe, die alle in der gleichen definierten Orientierung vorliegen. Dies führt zu einer enormen Verstärkung der Streuung, so dass diese leicht messbar wird. Ein weiterer Effekt ist, dass sich, durch die periodische Anordnung der Moleküle im Kristallgitter, das Streubild auf einzelne Streumaxima, die sogenannten Röntgenreflexe konzentriert, was die experimentelle Messung und die Auswertung der Streudaten stark vereinfacht.

2.2 Kristallisation von Proteinen

Die Grundvoraussetzung für die Durchführung einer Röntgenstrukturanalyse ist die Kristallisierbarkeit der zu untersuchenden Moleküle. Unter einem Kristall versteht man eine dreidimensionale, periodische Anordnung von Bausteinen. In dem gegebenen Fall sind die Bausteine, die den Kristall aufbauen, die zu untersuchenden Proteinmoleküle.

2.2.1 Das Prinzip der Kristallisation

Um ein Protein zu kristallisieren, muss man es aus der flüssigen Phase, also aus dem Zustand der Proteinlösung, in eine feste Phase überführen. Dies geht unter Zuhilfenahme von Substanzen, die die Löslichkeit von Proteinmolekülen verändern, und zwar in aller Regel verringern. Substanzen, die dies bewirken, nennt man auch Fällungsmittel oder Präzipitantien. Versetzt man die Proteinlösung langsam mit Fällungsmitteln, so verringert sich die Löslichkeit der Proteinmoleküle. Wenn die Sättigungsgrenze erreicht ist bzw.

überschritten wird, nennt man die Lösung übersättigt. In diesem Bereich, dem sogenannten *metastabilen Bereich* erfolgt aufgrund von kinetischer Hemmung noch keine Kristallbildung. Allerdings würden eventuell bereits vorhandene Kristallkeime wachsen. Wird die Löslichkeit weiter verringert, erreicht man den *labilen Bereich*. Hier kommt es, wenn die Lösungsbedingungen es erlauben, zur spontanen Bildung von Kristallkeimen und zum Wachstum von entstandenen Keimen. Das Ziel eines Kristallisationsexperimentes ist es, durch Verringerung der Löslichkeit der zu kristallisierenden Moleküle den *labilen Bereich* zu erreichen, Kristallkeime entstehen zu lassen, dann den *labilen Bereich* zu verlassen und die entstandenen Keime im *metastabilen Bereich* weiter wachsen zu lassen. Nur dann wird es zur Bildung von wenigen großen Kristallen kommen (Abb. 15).

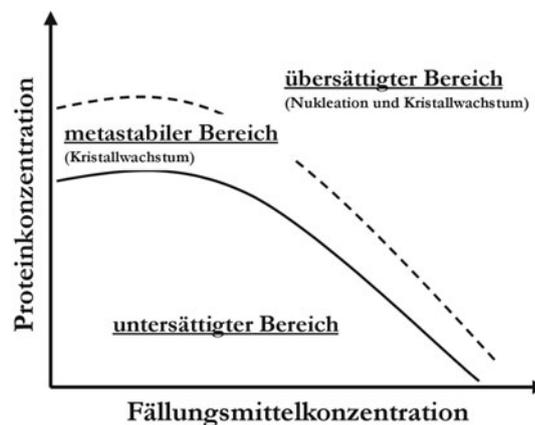


Abb. 15: Phasendiagramm einer hypothetischen Proteinlösung.

2.2.2 Faktoren, die die Löslichkeit von Proteinen beeinflussen

Die Löslichkeit eines Proteinmoleküls hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dies sind zum Beispiel die Temperatur, der pH-Wert, die Salzkonzentration und die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels, um nur einige zu nennen. All diese Parameter lassen sich ausnutzen, um die Löslichkeit des Proteins zu verändern und möglicherweise eine Kristallisation herbeizuführen.

2.2.3 Das Kristallisationsexperiment

Um ein Kristallisationsexperiment anzusetzen, geht man in der Regel so vor, dass man bestimmte Bedingungen in der Proteinlösung einstellt, und die Proteinlösung dann in einem luftdichten System gegen eine andere Lösung equilibriert, wobei die andere Lösung eine unterschiedliche Konzentration an Fällungsmittel aufweist. Eine beliebte Methode stellt das sogenannte Hängetropfenexperiment dar (Abb. 16). Ein kleiner Tropfen konzentrierter Proteinlösung hängt über einer Reservoirlösung und die „Einstellung des Gleichgewichtszustandes“ erfolgt langsam mittels Dampfdiffusion über die Gasphase. Da *a priori* nicht bekannt ist, bei welchen Bedingungen ein Protein kristallisiert, muss man sehr viele Experimente machen. Dazu wurden im Laufe der Zeit einige kommerziell erhältliche Kristallisations-Screens entwickelt. Üblicherweise werden pro Proteinkonstrukt ca. 500-1000 Einzelexperimente durchgeführt. Liegt danach immer noch keinerlei Anhaltspunkt für erfolgreiche Kristallisation oder für weitere Experimente vor, sollte das Konstrukt selbst auf chemische oder konformationelle Heterogenität überprüft werden.

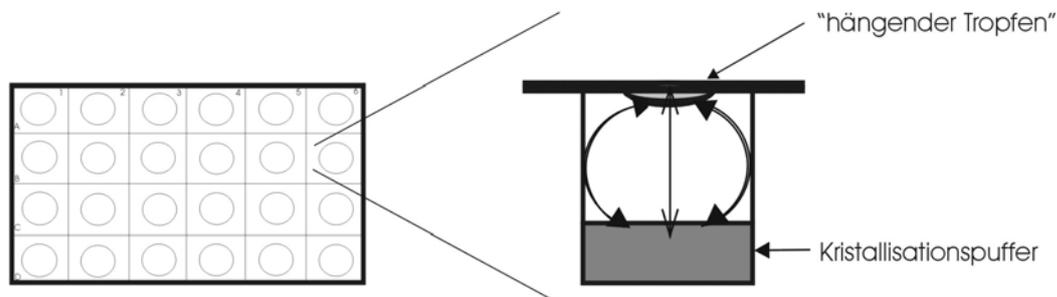


Abb. 16: Schema eines „hängenden Tropfens“.

2.2.4 Eigenschaften von Proteinkristallen

Proteinkristallisationsexperimente werden unter einem Lichtmikroskop oder mittels automatischer Systeme, sogenannter *Imager*, ausgewertet. Proteinkristalle, die für ein Streuexperiment brauchbar sind, weisen in der Regel 100 μm bis 500 μm Kantenlänge auf, und zwar möglichst in allen drei Dimensionen. Da in Kristallisationsexperimenten sehr oft anorganische Salze benutzt werden, kommt es manchmal und unter bestimmten Bedingungen vor, dass Salzkristalle entstehen. Diese lassen sich allerdings leicht durch Anfärben mit einem Farbstoff wie Methylblau von Proteinkristallen unterscheiden.

Während Proteinkristalle den Farbstoff aufnehmen und angefärbt werden können, bleiben Salz- oder Puffermolekülkristalle farblos. Ein weiterer Test auf Proteinkristalle ist der sogenannte Nadelttest. Salzkristalle sind spröde und können mit einer Nadel kaum zerstört werden, wohingegen Proteinkristalle sehr weich sind und oftmals schon beim Berühren mit der Nadel zerfließen. Der sicherste Test ist jedoch ein Diffraktionsexperiment, wie es im nächsten Absatz beschrieben wird. Aufgrund der viel größeren *Elementarzellen* (siehe Kapitel 2.2.5) von Proteinkristallen lassen sich diese anhand des Diffraktionsmusters sehr leicht von Kristallen von Salzen oder anderen kleinen Moleküle unterscheiden. Ein weiterer Unterschied von Proteinkristallen und Salzkristallen besteht darin, dass Proteinkristalle zu einem signifikanten Teil aus ungeordnetem Lösungsmittel bestehen. Dieser Lösungsmittelanteil beträgt üblicherweise etwa 50% des Kristallvolumens, kann aber in Extremfällen von 25% bis 80% reichen. Beschrieben wird er durch den sogenannten Matthewsparameter V_M (Matthews, 1968).

$$V_M = \frac{V_{EZ}}{NM_w} \quad \text{Gleichung 1}$$

wobei V_{EZ} das Volumen der Elementarzelle, N die Anzahl der Proteinmoleküle pro Elementarzelle und M_w das Molekulargewicht des kristallisierten Proteins darstellt. Angegeben wird V_M üblicherweise in der Einheit [$\text{\AA}^3/\text{Da}$]. Der Zusammenhang zwischen V_M und dem Lösungsmittelanteil x ist gegeben durch

$$x \approx 1 - \frac{1,23}{V_M} \quad \text{Gleichung 2}$$

2.2.5 Symmetrie von Kristallen

Wie zu Beginn erwähnt, ist ein Kristall eine dreidimensionale, periodische Anordnung von Bausteinen. Dies bedeutet, dass es ein kleinstes Volumen gibt, die sogenannte *Elementarzelle*, die zusammen mit der Periodizität des Kristallgitters bzw. den sogenannten Gittertranslationen (a , b , c , α , β , γ) ausreicht, den gesamten Kristall zu beschreiben (Abb. 17). Die Gittertranslationen entsprechen gleichzeitig den Dimensionen der Elementarzelle. Von Bravais konnte bereits vor 1849 gezeigt werden, dass es nur 14 verschiedene Möglichkeiten geben kann, wie Bausteine in drei Dimensionen periodisch

gepackt werden können. Diese 14 Möglichkeiten nennt man Bravaisgitter oder Translationsgitter. Die verschiedenen Gitter erlauben allerdings auch noch das Vorhandensein von Symmetrieelementen. Kombiniert man die 14 Bravaisgitter mit allen in einem Kristallgitter möglichen Symmetrieelementen erhält man 230 mögliche Raumgruppen. Diese Raumgruppen beschreiben sämtliche Möglichkeiten, Bausteine in ein dreidimensional periodisches Gitter zu packen (Hahn, 2002). Liegen in einem Kristall Symmetrieelemente vor, so lassen sich diese ausnutzen, um das kleinste zu beschreibende Volumen noch weiter zu reduzieren. Dies bezeichnet man als *asymmetrische Einheit*. Durch Anwendung der Symmetrieeoperationen gelangt man von der asymmetrischen Einheit zur Elementarzelle, und von da aus durch Anwendung der Periodizität zum gesamten Kristall. Da in einem Proteinkristall aufgrund der Chiralität der Aminosäuren und der Proteinmoleküle weder Inversionszentren noch Spiegelebenen vorkommen können, reduziert sich die Anzahl der möglichen Raumgruppen für Proteinkristalle auf 65.

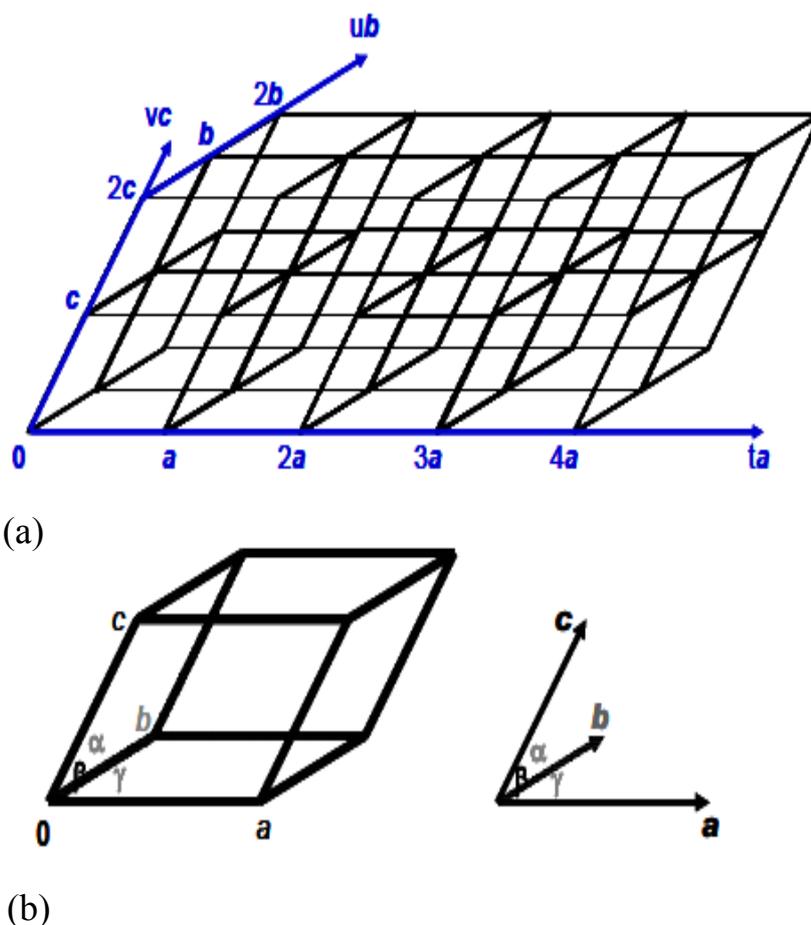


Abb. 17: Kristallgitter und Elementarzelle (Quelle: Stubbs, 2006).

(a) Ein makroskopischer Kristall kann in eine Vielzahl kleinerer Kristalle, bis zu seiner kleinsten Einheit, der Elementarzelle, unterteilt werden. (b) Elementarzellen werden durch die Länge ihrer Achsen a , b und c und die Winkel α , β und γ beschrieben.

2.3 Das Streuexperiment

Röntgenstreudaten von einem Kristall werden in einem sogenannten Streuexperiment aufgenommen. Für dieses Experiment benötigt man eine Röntgenquelle, einen Probenhalter für den Kristall und einen Detektor, der die gestreuten Strahlen misst. Eine weitere wichtige Komponente ist eine Rotationsachse, mit der ein Kristall während der Datenaufnahme gedreht werden kann. Ein Kristall ist ein dreidimensionaler Körper, der ein dreidimensionales Streubild liefert. Da pro Belichtung immer nur ein kleiner angenähert zweidimensionaler Ausschnitt aus dem dreidimensionalen Streubild aufgenommen werden kann, muss der Kristall im Laufe einer Messung in verschiedenen Orientierungen mit der Röntgenstrahlung belichtet werden. Das Gesamtstreubild wird dann aus den verschiedenen Einzelbildern zusammengesetzt.

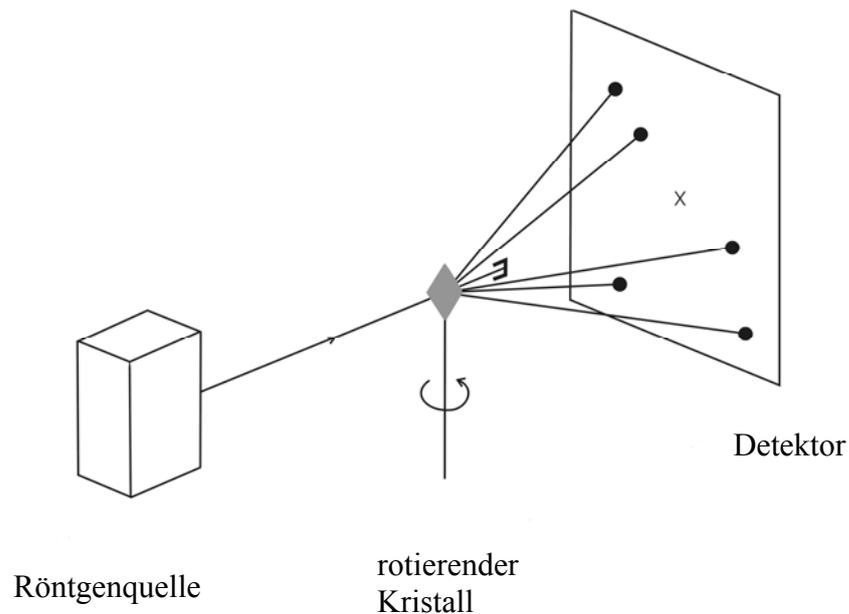


Abb. 18: Schematische Darstellung eines Streuexperimentes (Quelle: Wilmanns & Weiss, 2005).

2.3.1 Vorbereitung der Kristalle

Proteinkristalle wachsen in wässriger, gepufferter Lösung und sind auch nur in Lösung stabil. Somit verlieren sie ihre Streueigenschaften, wenn sie austrocknen. Dementsprechend müssen die Kristalle während der Messung feucht gehalten werden. Alternativ dazu können die Kristalle eingefroren werden. Dazu wird zu der Kristallisationslösung etwas Gefrierschutzmittel, z. B. Glycerin, Ethylenglykol o.ä.

gegeben, was Eisbildung verhindern soll. Beim schnellen Abkühlen auf 100 K im Stickstoffstrom oder in flüssigem Stickstoff erstarrt dann das Wasser im Kristall glasartig. Das Einfrieren hat den Vorteil, dass der Kristall während der Messung vor Strahlenschaden geschützt wird. Da es sich bei Röntgenstrahlen um ionisierende Strahlung handelt, die biologische Proben angreift, kann es bei langen Messungen vorkommen, dass die Kristalle langsam im Röntgenstrahl zerstört werden und ihre Streueigenschaften verlieren. Im eingefrorenen Zustand ist dieser Vorgang wesentlich verlangsamt. Praktisch wird das durchgeführt, indem der Kristall mit einer Nylonschleife geeigneter Größe aus dem Kristallisationstropfen herausgefischt wird, für einige Sekunden in Kristallisationslösung mit Gefrierschutzmittel getränkt wird, und dann direkt im Probenhalter im Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren wird. Während der gesamten Messung muss gewährleistet sein, dass der Kristall nicht aufzutauen beginnt und die Temperatur bei 100 K bleibt.

2.3.2 Röntgenquellen

Röntgenstrahlung wurde 1895 von Wilhelm Conrad Röntgen in einem Experiment entdeckt, bei dem ein Elektronenstrahl in einer Vakuumröhre mit Hochspannung auf eine Kupferanode hin beschleunigt wurde. Beim Auftreffen der Elektronen auf die Anode werden die Elektronen abgebremst und die kinetische Energie wird als elektromagnetische Strahlung frei. Diese bezeichnet man als *Bremsstrahlung*. Zusätzlich kommt es noch zum Herausschießen der inneren Elektronen des Anodenmaterials, was dazu führt, dass Elektronen von höheren Bahnen die freigewordenen Plätze einnehmen. Die Energie, die dabei frei wird, wird als Röntgenstrahlung abgegeben. Im Gegensatz zum Bremsstrahlungskontinuum ist diese spezifisch für das Anodenmaterial. Im Falle von Kupfer beträgt die Wellenlänge der freigewordenen spezifischen Röntgenstrahlung 1.5418 Å. Nach dem gleichen Prinzip funktionieren auch heute noch Röntgenquellen, die im Laboratoriumsmassstab, in der Form von Drehanoden (eine moderne Form, bei der die Anode in Rotation versetzt wird, um besser gekühlt werden zu können und somit um eine höhere Leistung zu erreichen) verwendet werden. Eine weitere Art, Röntgenstrahlung zu erzeugen, ist an einem Synchrotron. In einem Synchrotron werden Teilchenstrahlen auf nahezu relativistische Geschwindigkeiten beschleunigt. Um diese Teilchen von ihrer geraden Bahn abzulenken und auf eine Kreisbahn zu zwingen, werden starke Magnete, sogenannte Ablenkmagnete, verwendet. Die Energie, die über die Ablenkmagnete in die

Richtungsänderung des Teilchenstrahls gesteckt wird, wird als elektromagnetische Strahlung wieder frei. Im Vergleich zu herkömmlichen Röntgenquellen hat Synchrotronstrahlung den Vorteil, dass sie um Größenordnungen intensiver ist, dass es sich dabei um ein Wellenlängen- oder Energiekontinuum handelt, und dass der Strahl sehr eng (kollimiert) gehalten werden kann, d.h. dass die Intensität pro Flächeneinheit sehr hoch ist.

2.3.3 Röntgendetektoren

Um ein Röntgenstreuexperiment erfolgreich durchführen zu können, braucht man einen Detektor für Röntgenstrahlen. Dazu eignen sich zum Beispiel fotografische Filme, gasgefüllte Detektoren (z. B. sogenannte Geiger-Müller-Zähler), *Imaging Plates* und sogenannte *Charged-Coupled-Device* (CCD)-Detektoren. Da sämtliche in der Arbeit verwendeten Daten auf *Imaging Plates* bzw. CCD-Detektoren gesammelt wurden, beschränkt sich die Beschreibung im Folgenden auf diese beiden Detektorarten. Bei der Detektion von Röntgenstrahlen auf *Imaging Plates* erzeugt ein auftreffendes Röntgenquant ein Farbzentrum, d.h. einen metastabilen Elektronenzustand, in der Detektionsschicht. Dieses Farbzentrum ist über Stunden stabil und kann nach der Belichtung mittels eines Lasers ausgelesen werden. Im Anschluss daran wird die Platte mit intensivem weißem Licht gelöscht und steht für eine weitere Messung zur Verfügung. Bei CCD-Detektoren wird Röntgenstrahlung in einer Phosphorschicht in sichtbares Licht umgewandelt und über einen Lichtleiter auf einen Halbleiterchip geleitet, der dann elektronisch ausgelesen wird.

2.3.4 Durchführung des Röntgenstreuexperiments

Der vorbereitete Kristall wird auf die Röntgenapparatur montiert, falls er nicht direkt auf der Apparatur für die Messung eingefroren wurde. Der Kristall wird so zentriert, dass er sich bei der Rotation um die Drehachse immer im Strahl befindet. Um zu überprüfen, ob der Kristall die Röntgenstrahlung bis zur notwendigen Auflösung streut oder ob der Kristall durch die Vorbereitung Schaden genommen hat, wird eine Testmessung durchgeführt. Des Weiteren kann anhand der Testbelichtung die notwendige Belichtungszeit pro Aufnahme zumindest abgeschätzt werden. Der Kristall-Detektor-Abstand wird so eingestellt, dass möglichst die gesamte Detektoroberfläche bei der Datenaufnahme ausgenutzt wird. Im Anschluss wird die eigentliche Datensammlung gestartet. In Abhängigkeit von der Symmetrie der Kristalle muss dazu ein bestimmter

Rotationswinkel überstrichen werden (Dauter, 1997). Das Rotationsinkrement pro Aufnahme wird durch die erreichbare Auflösung, die Einheitszellkonstanten des Kristalls und die Mosaizität, die die Breite des Reflexes beschreibt, bestimmt. In der Regel beträgt es $0,1^\circ$ bis $2,0^\circ$. Der fertige Rohdatensatz besteht dann aus einem Satz Einzelbilder, die im Anschluss an die Messung ausgewertet werden müssen.

2.3.5 Datenauswertung

Die Auswertung der Rohdaten besteht aus drei Schritten: (i) Indizierung, (ii) Integration und (iii) Skalierung. Bei der Indizierung wird ein kleiner Teil des Datensatzes, im Extremfall ein einziges Streubild, verwendet, um anhand der Position der Streumaxima auf dem Streubild, die Einheitszelldimensionen des Kristalls, sowie die Kristallorientierung zu bestimmen und zu verfeinern. Sind diese bekannt, kann die Lage und Position jedes weiteren Streumaximums auf allen Folgebildern vorausberechnet werden. Im zweiten Schritt, werden aus den Rohdaten korrigierte Intensitäten errechnet. Dazu werden die Streumaxima integriert, und anhand von Hintergrundabschätzungen und diversen geometrischen Korrekturen bereinigt. Im dritten Schritt werden alle Einzelbilder auf ein beliebig gewähltes Referenzbild skaliert und die mehrfach gemessenen Reflexe zusammengemittelt. Damit ergibt sich dann eine Liste aus Einzelreflexen (hkl) mit der jeweils zugehörigen Reflexintensität $I(hkl)$ und einer Fehlerabschätzung für die Intensität des entsprechenden Reflexes $\sigma I(hkl)$. Ausserdem werden beim Skalierungsschritt diverse Qualitätsindikatoren berechnet, anhand derer die nutzbare Auflösung und die Qualität des Datensatzes abschätzen werden kann. In aller Regel wird die Prozessierung der Rohdaten mit einem frei erhältlichen Computerprogramm oder Programmsystem durchgeführt. Die in dieser Arbeit verwendeten Daten wurden entweder mit den Programmen XDS/XSCALE (Kabsch, 1993), DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) oder MOSFLM/SCALA (CCP4, 1994; Leslie, 1992; Evans, 2005) ausgewertet.

2.3.6 Qualität der Röntgendaten

Qualitätsindikatoren, die die Qualität eines Streudatensatzes beschreiben, werden im Folgenden diskutiert. Zum einen sollte ein Datensatz möglichst komplett sein, d.h. alle möglichen Röntgenreflexe sollten gemessen worden sein. Da dies durch experimentelle Einschränkungen oft nicht zu erreichen ist, stellt die *completeness* eines Datensatzes ein sehr wichtiges Qualitätskriterium dar. Diese sollte für einen guten Datensatz so nah wie möglich an 100% heranreichen. Ein weiteres Kriterium ist die mittlere Redundanz oder

Multiplizität der gemessenen Reflexe, die angibt, wie oft im Mittel ein Reflex gemessen wurde. Je häufiger ein Reflex gemessen wurde, also je höher die Multiplizität, desto besser ist der Mittelwert für die Intensität, den man aus den Einzelmessungen errechnen kann. Ein Wert, der angibt wie stark die Einzelmessungen um den Mittelwert streuen ist der sogenannte *merging R-factor* oder R_{merge} :

$$R_{\text{merge}} = 100 \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_i |I_i(\text{hkl}) - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_i I_i(\text{hkl})} \quad \text{Gleichung 3}$$

wobei $I_i(\text{hkl})$ die Einzelmessung i der Intensität I des Reflexes (hkl) bezeichnet und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die über alle Einzelmessungen gemittelte Intensität $\langle I \rangle$ des Reflexes (hkl) . Summiert wird dabei zuerst über die Einzelmessungen (i) und dann über alle Reflexe (hkl) . Gute Datensätze sollten einen R_{merge} von etwa 5% aufweisen. Ein weiterer sehr wichtiger Parameter, der die Datenqualität beschreibt, ist das Signal-zu-Rausch-Verhältnis $I/\sigma(I)$. In der Regel wird die mittlere Intensität geteilt durch die mittlere Standardabweichung in Abhängigkeit von der Auflösung angegeben. Die höchste zu verwendende Auflösung des Datensatzes sollte einen mittleren $I/\sigma(I)$ -Wert von mindestens 2,0 aufweisen.

2.4 Strukturbestimmung

Aus dem erhaltenen Streudatensatz lässt sich die dreidimensionale Struktur des untersuchten Moleküls berechnen. Das Verfahren dazu soll im Folgenden dargestellt werden. Dabei ist es hilfreich, zuerst den Vorgang der Streuung von Röntgenstrahlen an Kristallen zu diskutieren.

2.4.1 Streuung von Röntgenstrahlen an Kristallen

Wie im Abschnitt 1.1 erwähnt wurde, erfolgt die Streuung von elektromagnetischer Strahlung an Materie über die Wechselwirkung von Elektronen mit dem elektrischen Vektor der elektromagnetischen Welle. Naturgemäß interagieren die positiv geladenen Atomkerne auch mit der elektromagnetischen Welle, aber aufgrund der um drei Größenordnungen größeren Masse der Kerne kann dieser Effekt praktisch vernachlässigt

werden. Für die Streuung von EM-Strahlung an Materie gilt die allgemeine Streugleichung:

$$f(\mathbf{s}) = \int \rho(\mathbf{r}) e^{2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}} dV \quad \text{Gleichung 4}$$

wobei $\rho(\mathbf{r})$ die Elektronendichteverteilung der Probe beschreibt, \mathbf{s} den Streuvektor und $f(\mathbf{s})$ die in Richtung \mathbf{s} getreute Welle. Das Integral läuft hier über das gesamte Probenvolumen. Geht man von einer nicht-periodischen Probe zu einer periodischen Probe, d.h. einem Kristall, über, vereinfacht sich die Gleichung, da aufgrund der Periodizität der Probe Streuung nur in bestimmte Richtungen erfolgt. Diese Richtungen bezeichnen die Röntgenreflexe (hkl). Der Streuvektor \mathbf{s} wird durch die Richtungen, die durch (hkl) definiert werden, ersetzt. Da die Probe aus Atomen besteht, kann man über alle in der Probe vorhandenen Atome summieren. Die allgemeine Streugleichung reduziert sich damit zur Strukturfaktorgleichung:

$$F(\text{hkl}) = \sum_j f e^{2\pi i (\text{hx}_j + \text{ky}_j + \text{lz}_j)} \quad \text{Gleichung 5}$$

wobei f den Streubeitrag eines einzelnen Atoms mit den Koordinaten (x, y, z) beschreibt, (hkl) einen Röntgenreflex und $F(\text{hkl})$ den sogenannten Strukturfaktor. Der Strukturfaktor ist durch eine Amplitude und eine Phase beschriebene Welle, die in die durch (hkl) definierte Richtung gestreut wird.

2.4.2 Vom Streudatensatz zur Struktur

Kennt man $f(\mathbf{s})$ in Amplitude und Phase lässt sich Gleichung 4 einfach nach $\rho(\mathbf{r})$ auflösen

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \int f(\mathbf{s}) e^{-2\pi i \mathbf{s} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{s} \quad \text{Gleichung 6}$$

und man erhält eine Gleichung für die Elektronendichteverteilung der Probe, die ein dreidimensionales Abbild der Struktur der Probe ist. In diesem Fall läuft das Integral über

das gesamte Streubild. Für den Fall der Streuung an Kristallen vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F(hkl) e^{-2\pi i(hx + ky + lz)} \quad \text{Gleichung 7}$$

bzw. zu:

$$\rho(\mathbf{r}) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} |F(hkl)| \cos[-2\pi i(hx + ky + lz) + \alpha(hkl)] \quad \text{Gleichung 8}$$

wobei $|F(hkl)|$ die Amplitude der in Richtung (hkl) gestreuten Welle beschreibt und $\alpha(hkl)$ die Phase der Welle. Sind beide bekannt, lässt sich $\rho(\mathbf{r})$ berechnen.

2.4.3 Das kristallographische Phasenproblem

In einem Streuversuch misst man die Intensitäten I aller Röntgenreflexe (hkl) . Da die Intensität einer Welle proportional zum Quadrat der Amplitude der Welle ist, geht die Phaseninformation bei der Intensitätsmessung verloren. Aus der gemessenen Intensität lässt sich zwar die Amplitude der gestreuten Welle $|F(hkl)|$ rekonstruieren, aber nicht die Phase $\alpha(hkl)$. Das bezeichnet man als kristallographisches Phasenproblem.

2.4.4 Methoden zur Phasenbestimmung

Im Laufe der Jahre wurde eine Reihe von Methoden zur Lösung des kristallographischen Phasenproblems entwickelt. Die historisch gesehen wichtigste Methode basiert auf dem Prinzip des isomorphen Ersatzes (SIR = *single isomorphous replacement* oder MIR = *multiple isomorphous replacement*). Hierbei werden die Reflexintensitäten von einem nativen Proteinkristall mit den entsprechenden Intensitäten von einem oder mehreren Schweratomderivaten des Proteinkristalles verglichen. Aus den erhaltenen Unterschieden lassen sich in einem ersten Schritt die Positionen der gebundenen Schweratome errechnen und in einem weiteren Schritt die Phasen. Hierbei verwendet man Schweratome von Hg, Pt, Au oder andere, weil diese sehr viele Elektronen aufweisen und so gut messbare Effekte hervorrufen. Eine weitere Methode ist die sogenannte MAD (*multiple wavelength anomalous dispersion*)-Methode. Hierbei nutzt man die besonderen Streueigenschaften

von im Kristall vorhandenen Elementen an ihren jeweiligen Röntgenabsorptionskanten aus. Dazu müssen allerdings mehrere Messungen bei Wellenlängen an einer Absorptionskante durchgeführt werden, was wiederum bedingt, dass man eine Röntgenquelle zur Verfügung hat, deren Wellenlänge man sehr genau einstellen kann. In der Regel werden diese Messungen daher an einem Synchrotron durchgeführt. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden ist es möglich, in einem Protein die Aminosäure Methionin durch die isostere Aminosäure Selenomethionin zu ersetzen. Die Röntgenabsorptionskante von Se liegt mit etwa $\lambda = 0,98 \text{ \AA}$ in einem sehr gut zugänglichen Wellenlängenbereich. Daher hat sich die MAD-Methode in den letzten 15-20 Jahren zu der Standardmethode der *de novo* Strukturlösung in der makromolekularen Kristallographie entwickelt. Ist bereits eine zur Zielstruktur ähnliche Struktur bekannt, so lässt sich diese heranziehen, um mit Hilfe der Methode des molekularen Ersatzes (MR = *molecular replacement*) das Phasenproblem zu lösen.

2.4.5 Die Methode des Molekularen Ersatzes

Will man eine Struktur bestimmen und kennt bereits eine ähnliche Struktur, deren Koordinaten zugänglich sind, so kann man diese Struktur heranziehen, um das kristallographische Phasenproblem zu lösen. Diese Methode nennt man die Methode des molekularen Ersatzes oder *Molecular Replacement* (MR). In der Regel wird die ähnliche Struktur auf der Basis von Sequenzvergleichen identifiziert. Generell funktioniert MR, wenn die Suchstruktur eine Sequenzidentität von mindestens 40% zur Zielstruktur aufweist. Unter der Annahme, dass die Suchstruktur der Zielstruktur ähnlich ist, reduziert sich das Problem der Strukturlösung auf die Bestimmung von 6 Parametern: 3 Rotations- und 3 Translationsparameter. In einem ersten Schritt werden die Rotationsparameter bestimmt. Dazu wird die Suchstruktur in allen möglichen Orientierungen mit den gemessenen Daten verglichen, die sogenannte Rotationsfunktion. Diese Funktion hat ein Maximum bei der richtigen Orientierung der Suchstruktur. Danach berechnet man die sogenannte Translationsfunktion. Dazu wird das bereits richtig orientierte Modell der Suchstruktur durch die gesamte asymmetrische Einheit des Kristalls translatiert und die Position gesucht, bei der die Übereinstimmung mit den gemessenen Daten am größten ist. Hat man das Maximum der Translationsfunktion gefunden, hat man die Struktur im Prinzip gelöst. Diese Berechnungen werden zum Beispiel mit den Computerprogrammen MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997; CCP4 1994) oder PHASER (McCoy *et al.* 2007) durchgeführt.

2.4.6 Strukturverfeinerung und Validierung

Ist die Struktur im Prinzip gelöst, muss sie nur noch an die gemessenen Daten angepasst werden. Diesen Vorgang nennt man Strukturverfeinerung. Nach Gleichung 5 kann man, wenn man einen Satz Koordinaten zur Verfügung hat, ausrechnen, welche Röntgenintensitäten auf der Basis der Koordinaten hätten gemessen werden müssen. Die zugehörigen Strukturamplituden bezeichnet man als F_{calc} (calc = *calculated* = berechnet). Diese Werte lassen sich mit den gemessenen Werten F_{obs} (obs = *observed* = beobachtet) vergleichen. Man erhält den sogenannten kristallographischen R-faktor:

$$R = 100 \frac{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}(\text{hkl}) - F_{\text{calc}}(\text{hkl})|}{\sum_{\text{hkl}} F_{\text{obs}}(\text{hkl})} \quad \text{Gleichung 9}$$

Dieser R-faktor gibt an, wie sich sehr die gemessenen Werte $F_{\text{obs}}(\text{hkl})$ von den aus dem Modell berechneten $F_{\text{calc}}(\text{hkl})$ unterscheiden. Je kleiner der R-faktor, desto grösser die Übereinstimmung. Der eigentliche Prozess der Verfeinerung bezeichnet nun eine mathematische Methode, eine Funktion, die den Term $|F_{\text{obs}}(\text{hkl}) - F_{\text{calc}}(\text{hkl})|$ enthält, zu minimieren. Da $F_{\text{calc}}(\text{hkl})$ von einer großen Menge an Parametern abhängt (drei Koordinaten pro Atom plus einen Temperaturfaktor) ist das kein triviales Unterfangen und kann nur computergestützt durchgeführt werden. Zusätzlich muss bei der Verfeinerung berücksichtigt werden, dass die Geometrie der Bindungslängen und Bindungswinkel erhalten bleibt. Dies wird durch die Einführung von sogenannten *Restraints* oder Randbedingungen in die Verfeinerungsprozedur erreicht. Dazu verwendet man Idealwerte für Bindungslängen und Bindungswinkel, wie sie zum Beispiel von Engh & Huber, (1991) aus hochaufgelösten Studien an Peptiden abgeleitet wurden. Ein Problem bei der Verfeinerung stellt das sogenannte Überfitten dar, d.h. das Einbringen von zu vielen zu verfeinernden Parametern in das Modell (zum Beispiel in der Form von zusätzlichen Wassermolekülen), die aber von den gemessenen Daten nicht unterstützt werden. Um dies zu verhindern, wurde 1992 der sogenannte freie R-faktor eingeführt (Brünger *et al.*, 1992). Der freie R-faktor wird für den Teil der Daten (maximal 10% der gesamten Daten, aber mindestens 1000 Reflexe) berechnet, die nicht für die Verfeinerung verwendet werden. Es empfiehlt sich daher, vor der ersten Verfeinerungsrechnung den gesamten Datensatz in ein *Working Set* und ein *Test Set* aufzuspalten. Die Verfeinerung

erfolgt dann gegen das *Working Set*, die Berechnung des freien R-faktors gegen das *Test Set*. Sämtliche Verfeinerungsrechnungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; CCP4, 1994) durchgeführt. Eine gut verfeinerte Struktur wird einen kristallographischen R-faktor von etwa 20% oder weniger aufweisen, einen freien R-faktor, der nur wenige Prozent darüber liegt und geometrische Abweichungen von Idealwerten für Bindungslängen und Bindungswinkel, die 0,02 Å und 2,0° nicht übersteigen.

2.4.7 Manuelle Anpassungen und Elektronendichtedarstellungen

Werden im Verlauf der Verfeinerungsprozedur Änderungen an der Struktur nötig, die außerhalb des Konvergenzradius des Verfeinerungsprogramms liegen, müssen diese Änderungen manuell in die Struktur eingefügt werden. Dies wird mit Hilfe eines Graphikprogramms durchgeführt. Das dazu in dieser Arbeit verwendete Programm ist COOT (Emsley & Cowtan, 2004). Dazu werden die Koordinaten des Modells eingelesen und graphisch dargestellt. Zusätzlich zu den Koordinaten werden noch zwei Elektronendichtekarten berechnet und auf die Koordinaten überlagert. Bei den Elektronendichtekarten handelt es sich zum einen um die $(2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ -Karte, die das Modell beschreibt, und um die $(F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}})$ -Karte (auch Differenzelektronendichtekarte genannt), die beschreibt, was im Modell zu viel ist, und was noch fehlt. Ein Maximum in der Differenzkarte bedeutet, dass das Modell an dieser Stelle ergänzt werden muss, ein Minimum bedeutet, dass das Modell an dieser Stelle verändert werden muss. Durch das manuelle Fitten des Modells an die beiden Elektronendichtekarten wird ein verbessertes Modell erzeugt, welches dann wieder weiter verfeinert werden kann. Insgesamt wurde für die in dieser Arbeit untersuchten Komplexe bis zu 30-mal zwischen manueller Intervention und computergestützter Verfeinerung iteriert.

2.5 Strukturvergleiche und Strukturüberlagerungen

Um die im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Strukturen miteinander und mit anderen Strukturen zu vergleichen, müssen sie optimal überlagert werden. Dies geschieht durch Definition einer Referenzstruktur, auf die die damit zu vergleichenden Strukturen auf die Referenzstruktur rotiert und translatiert werden. Innerhalb des Graphikprogramms COOT (Emsley & Cowtan, 2004) stehen dafür zwei Methoden zur Verfügung. Die erste ist die Überlagerung nach dem Prinzip von Kabsch (1976). Hierbei wird die rotierte Struktur auf die Referenzstruktur so angepasst, dass die mittlere quadratische Abweichung von

equivalenten Atompositionen minimal ist. Eine weitere Methode beruht auf dem Ansatz des *Secondary Structure Matching* (SSM) (Krissinel & Henrick, 2004). Hierbei werden lediglich Sekundärstrukturelemente zur Strukturüberlagerung herangezogen. Während sich die zweite Methode sowohl für sehr ähnliche Strukturen wie auch für weiter voneinander entfernte Strukturen eignet, funktioniert die erste Methode nur wenn äquivalente Atompositionen für die Überlagerung definiert werden können, also bei sehr ähnlichen Strukturen. Da die in dieser Arbeit untersuchten Strukturen allesamt Varianten eines Proteins sind, wurde hier im wesentlichen auf diese Methode zurückgegriffen.

3 Materialien & Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Alle in der Arbeit verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel 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 Appllichem. bezogen. Alle Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, mit bidestilliertem Wasser hergestellt.

Glutathion (GSH, oxidiert)	Fluka
Glutathion (GSSG, reduziert)	Fluka
Guanidiniumchlorid	NIGU Chemie
Polyethylenglycol (PEG)	Fluka
Pefachrome tPA® (Methylsulfonyl-cyclohexylalanyl-glycyl-arginyl-p-nitroanilid)	Pentapharm AG

3.1.2 Standards und Kits

100 bp DNA-Leiter	New England-Biolabs
1 kb DNA-Leiter	New England-Biolabs
SDS-PAGE Größenstandards; <i>broad range</i>	Biorad
Crystallization Screening Kits	Hampton Research, Jena Bioscience und Sigma
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QuickChange® Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene

Bei allen *Kits* wurden nur die dafür vorgesehenen Puffer bzw. Lösungen verwendet und nach Anleitung des Herstellers verfahren.

3.1.3 Enzyme und weitere Proteine

<i>Bam</i> HI	Fermentas
DNaseI (Benzonase)	Sigma

<i>DpnI</i>	Stratagene
Enterokinase	Roche
boviner Faktor Xa	Haematologic Technologies
Lysozym	Sigma
Restriktionsendonuklease <i>KpnI</i>	Fermentas
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonuklease <i>BamHI</i>	New England Biolabs
Restriktionsendonuklease <i>NdeI</i>	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
bovines, pankreatisches Trypsin	Sigma

3.1.4 Medien

LB-Medium

LB-Medium 10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl
(autoklavieren)

LB-Agar LB-Medium mit zusätzlich 1% w/v Agar-Agar

M9-Minimalmedium

10x M9-Puffer	59,2 g/L Na ₂ HPO ₄ , 30 g/L KH ₂ PO ₄ , 5 g/L NaCl
1000x MgSO ₄	5 g MgSO ₄ *7 H ₂ O ad 20 mL H ₂ O (steril filtriert)
1000x CaCl ₂	0,28 g CaCl ₂ *2 H ₂ O ad 20 mL H ₂ O (steril filtriert)
1000x Amp	50 mg/mL (steril filtriert)
10x ¹⁵ NH ₄ Cl	0,5 g/L (steril filtriert)
10x ¹³ C-Glukose	4 g ad 100 mL H ₂ O
100x Spurenelemente	9 mL 10x SL4, 10 mL 10x SL6 ad 100 mL H ₂ O (steril filtriert)
10x SL4	3,42 mL 0,5 M EDTA, 200 mg Fe(II)SO ₄ *7 H ₂ O ad 90 mL H ₂ O
10x SL6	100 mg ZnSO ₄ *7 H ₂ O, 39,2 mg MnCl ₂ *2H ₂ O, 300 mg H ₃ BO ₃ , 106 mg CoCl ₂ , 10 mg CuCl ₂ *2 H ₂ O, 20 mg NiCl ₂ *6 H ₂ O, 30 mg NaMoO ₄ *2 H ₂ O ad 1 L H ₂ O

Die Medienbestandteile (M9-Puffer, Calciumchlorid, Magnesiumchlorid und bidestilliertes Wasser) wurden in Schüttelkolben vorgelegt und bei 120°C dampfsterilisiert. Unmittelbar vor der Expression erfolgte die Zugabe der Ampicillin-, ¹⁵N-Ammoniumchlorid- und Spurenelementlösung mittels Sterilfilter (0,22 µM) unter der Laminaflowbox. Die separat autoklavierte ¹³C-Glukose-Lösung wurde im Anschluss auf die Kolben verteilt.

3.1.5 Stammlösungen

Antibiotika:

Ampicillin	100 mg/mL in ddH ₂ O (steril filtriert)
Chloramphenicol	50 mg/mL in Ethanol (steril filtriert)

Die Antibiotika (Ampicillin für XL1 - Blue und BL21(DE3); Ampicillin und Chloramphenicol für BL21(DE3) pLysS) wurden dem Medium im Verhältnis 1:1000 v/v zugesetzt (LB- und M9-Minimalmedium).

IPTG:

1 M in ddH₂O (steril filtriert)

Zur Induktion der Expression wurde IPTG der Bakterienkultur im Verhältnis 1:1000 v/v zugegeben.

3.1.6 Bakterienstämme und Plasmide

Für die Klonierung der Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten wurde der kompetente *E. coli*-Stamm XL1 Blue, für die Expression der kompetente *E. coli*-Stamm BL21(DE3) pLysS verwendet.

Trypsin-spezifisches EglinC wurde ebenfalls in den kompetenten *E. coli*-Stamm XL1 Blue transformiert, wohingegen für die Expression der kompetente *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet wurde (Bezugsquelle aller Stämme: Novagen).

Bakterienstämme:

E. coli XL1 Blue: Genotyp *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^R)*.

E. coli BL21(DE3): Genotyp $F^- ompT, hsdS_B (r_B^-, m_B^-), dcm, gal, \lambda(DE3)$

E. coli BL21(DE3) pLysS: Genotyp $F^- ompT, hsdS_B (r_B^-, m_B^-), dcm, gal, \lambda(DE3), pLysS, Cm^R$

Plasmide:

Der pET-3a Vektor (Novagen) wurde als Expressionsvektor für die Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten verwendet. Er umfasst 4640 Basenpaare und besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen, eine *multiple cloning site* unter Kontrolle des *T7*-Promotors und einen N-terminalen $(His)_6$ -tag. Die cDNAs für die bovinen Trypsinogen-Varianten, die zur Aktivierung über eine Enterokinasespaltstelle verfügen, wurden in den Arbeiten von Rauh *et al.*, (2002) und Tziridis, (2008) hergestellt und in die pET-3a Vektoren über *Bam*HI und *Nde*I-Restriktionsschnittstellen eingefügt.

Für die Expression von trypsin-spezifischem Eglin C wurde der pET-15b-TEV Vektor verwendet, der freundlicherweise von Dr. Constanze Breithaupt zur Verfügung gestellt wurde. Dieser Expressionsvektor besitzt neben dem Ampicillin-Resistenzgen und der *multiple cloning site* unter Kontrolle des *T7*-Promotors, einen N-terminalen $(His)_6$ -tag sowie daran anschließend eine TEV-Protease Schnittstelle. Die Eglin C-cDNA wurde zwischen die *Kpn*I- und *Bam*HI-Restriktionsschnittstellen eingefügt.

3.1.7 Lösungen und Puffer

Puffer für die *Inclusion Body*-Präparation:

IB-I	0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 1 mM EDTA
IB-II	60 mM EDTA, 6 % w/v Triton X 100, 1,5 M NaCl; pH 7,0
IB-IIA	60 mM EDTA, 3 % w/v Triton X 100, 1,5 M NaCl; pH 7,0
IB-III	0,1 M Tris/HCl pH 7,0, 20 mM EDTA
IB-IIIA	6 M Gua-HCl, 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 1 mM EDTA
IB-IV	4 M Gua-HCl pH 3,5

Puffer für Renaturierung:

Renaturierungspuffer 1 mM EDTA, 100 mM Borsäure, 1 M Arginin-HCl, 100 mM Tris/HCl pH 8,5, 7°C, 60 mM CaCl₂, 0,3 mM GSSG, 3 mM GSH

Tris-Acetat-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 4,5, 50 mM Na-Acetat, 20 mM CaCl₂

Puffer für chromatographische Reinigungsverfahren:*i) SBTI-Agarose von Trypsin-Varianten*

SBTI-I 50 mM Tris/HCl pH 6,5, 20 mM CaCl₂

SBTI-II 50 mM Tris/HCl pH 6,5, 500 mM NaCl, 20 mM CaCl₂

SBTI-III 100 mM Ameisensäure; pH 2,0

Trypsin-Lagerpuffer 10 mM CaCl₂, 1 mM HCl pH 2,0

ii) Ni-NTA-Reinigung von trypsin-spezifischem Eglin C

Ni-NTA-I 25 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol

Ni-NTA-II 25 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol

TEV-Spaltpuffer 25 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,4, 125 mM NaCl, 5 mM DTT

iii) Proteinkomplexbildung

S75-Puffer 50 mM MES/NaOH pH 6,0, 125 mM NaCl, 1 mM CaCl₂

S75-Dialysepuffer 20 mM MES/NaOH pH 6,0, 20 mM NaCl, 1 mM CaCl₂

Puffer für Faktor Xa-Inhibitionsassay :

Assay-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 154 mM NaCl, 10 mM CaCl₂

Puffer für Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) :

DSC-Puffer-1	50 mM MOPS/NaOH pH 7,0, 20 mM CaCl ₂ , 154 mM NaCl
DSC-Puffer-2	20 mM Cacodylat/NaOH pH 7,0, 10 mM CaCl ₂
DSC-Puffer-3	50 mM Borat/NaOH pH 8,0, 10 mM CaCl ₂
DSC-Puffer-4	5 mM Borat/NaOH pH 8,0, 10 mM CaCl ₂
DSC-Puffer-5	5 mM Borat/NaOH pH 8,0, 1 mM CaCl ₂

Puffer für Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC):

ITC-Puffer-1	50 mM MES/NaOH pH 6,0, 125 mM NaCl, 1 mM CaCl ₂
ITC-Puffer-2	20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM CaCl ₂

Puffer für Kristallisationsexperimente:

Kommerzielle Screens: *Sigma Cryo Kit, Sigma Basic Kit, Jena Bioscience 1-10, Hampton Research, Home Factorial Solutions*

Kristallisationspuffer 18% w/v PEG 10 000, 20 % w/v Glycerin, 100 mM Tris/HCl pH 8,5/9,0, 100 mM NaCl

Puffer für NMR-Studien:

NMR-Puffer 50 mM Tris/HCl pH 6,0, 50 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM Acetat-D₄, 0,02% Azid

Puffer für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese:

4x Sammelgelpuffer 0,5 M Tris/HCl pH 6,8, 0,4% w/v SDS
4x Trenngelpuffer 1,5 M Tris/HCl pH 8,8, 0,4% w/v SDS
10x Laemmli-Laufpuffer 250 mM Tris/HCl pH 8,9; 200 mM Glycerin; 1% w/v SDS
2x SDS-Probenpuffer 1,75 mL Sammelgelpuffer; 1,5 mL Glycerin; 5 mL 10% w/v SDS, 1,25 mL Bromphenolblau; 0,5 mL β -Mercaptoethanol

Sammelgel (5% w/v Acrylamid) (ausreichend für 2 Gele)

0,88 mL 30% Acrylamid/0,8% Bisacrylamid, 0,8 mL
4x Sammelgelpuffer, 2,4 mL H₂O, 50 µL 10% SDS,
50 µl 10% APS, 3 µl TEMED

Trenngel (15% w/v Acrylamid) (ausreichend für 2 Gele)

4,2 mL 30% Acrylamid/0.8% Bisacrylamid, 3,1 mL
4x Trenngelpuffer, 0,9 mL H₂O, 60 µl 10% SDS,
60 µl 10% APS, 4 µl TEMED

Puffer für Tris/Tricin-Gele:

3x Gelpuffer 181,5 g Tris/HCl pH 8,45, 1,5 g SDS ad 500 mL
dH₂O

10x Anodenpuffer 121 g Tris/HCl pH 8,9 ad 500 mL dH₂O;

10x Kathodenpuffer 60,5 g Tris-Base, 89,6 g Tricin, 5 g SDS ad 500 mL
dH₂O

3x SDS-Probenpuffer 1,75 mL 10x Kathodenpuffer, 1,5 mL Glycerin,
1,5 mL 20% w/v SDS, 1,25 mL Bromphenolblau,
0,5 mL β-Mercaptoethanol

Sammelgel (4 % w/v Acrylamid) (ausreichend für 2 Gele)

0,52 mL 30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid, 1 mL
3x Gelpuffer, 2,48 mL H₂O, 50 µL 10% SDS, 50 µL
10% APS, 3 µL TEMED

Trenngel (16 % w/v Acrylamid) (ausreichend für 2 Gele)

4,4 mL 30% Acrylamid / 0.8% Bisacrylamid, 0,8 mL
Glycerin, 2,66 mL 3x Gelpuffer, 0,133 ml H₂O, 60
µl 10% SDS, 60 µL 10% APS, 4 µl TEMED

Puffer und Lösungen für die Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen:

Fairbanks A 25% w/v Isopropanol; 10% w/v Essigsäure; 0,05%
w/v Brillant Blau G250

Fairbanks B 10% w/v Isopropanol; 10% w/v Essigsäure; 0,05%
w/v Brillant Blau G250

Fairbanks C	10% w/v Essigsäure; 0,02% w/v Brillant Blau G250
Fairbanks D	10% w/v Essigsäure

Puffer für Agarose-Gelelektrophorese:

50x TAE-Puffer	2 M Tris/HCl pH 8,3, 1 M Essigsäure; 0,1 M EDTA
5x Probenauftragspuffer	50% w/v Glycerin; 0,05% w/v Bromphenolblau in 1x TAE-Puffer

Die Puffer für die Solubilisierung (IB IIIA), Renaturierung und chromatographischen Reinigungsmethoden wurden vor Gebrauch durch 0,2 µm-Filter steril filtriert und entgast. ITC- und NMR-Puffer wurden lediglich steril filtriert.

3.1.8 Apparaturen

Geräte:

Äkta FPLC-Anlage mit Fraktionssammler Frac-950	Amersham Pharmacia Biosciences
Drehanoden-Röntgengenerator Micromax 007 mit konfokaler Optik	Rigaku MSC
Elektrophorese-Apparatur Hoefer™ SE260	Amersham Pharmacia Biosciences
Hochdruckhomogenisator Gaulin Micron Lab40	APV
Imageplate-System R-Axis IV++	Rigaku MSC
OasisImager	Veeco
VP-DSC	Microcal LLC
VP-ITC	Microcal LLC
Kühlzentrifugen Avanti J-20, J-25 und J-30i	Beckmann
Microplatereader VERSAMax	Molecular Devices
Mikroskop: MZ16	Leica
Rotoren JA 30.50, JA 10, JLA 8.1000	Beckmann
2L-Rückfaltungsreaktor, mit Rührblatt und Peristaltik-Pumpe	FairManTec
Pipettierrobotter	Cartesian

Speed Vac	Savant
Thermocycler Mastercycler Gradient	Eppendorf
Ultra-Turrax T25 Jane & Kunkel	IKA-Labortechnik
UV/Vis-Spektrometer Ultrospec 4000	Amersham Pharmacia Biosciences

Chromatographiematerialien:

Superdex 75- <i>prep grade HiLoad</i> 26/60	Amersham Pharmacia Biosciences
HisTrap Crude-Säulen, 5 mL	Amersham Pharmacia Biosciences
HisTrap HP-Säulen, 5 mL	Amersham Pharmacia Biosciences
SBTI-Agarose	Sigma-Aldrich

Zubehör:

<i>Crossflow</i> Membrankassette	Sartorius
MWCO: 10000 Da	
Dialyseknöpfe, 1 mL	Roth
Easyxtal Tool	Qiagen
Kristallisationsplatten 96- <i>well</i>	Greiner
Spectrapor Dialyseschläuche	Roth
MWCO: 3500,10000 Da	
Sterilfilter mit PVDF-Membran, 0,22 µm	Roth
Zentrifugen-Filtereinheiten Amicon	Millipore
Ultra-15 und Ultra-4 MWCO: 3500, 5000, 10000 Da	

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Herstellung der Expressionsplasmide

Im Verlauf der Arbeit wurden katalytisch inaktive Trypsin-Varianten durch ortsgerichtete Mutagenese hergestellt und trypsin-inhibierendes Eglin C wurde subkloniert.

3.2.1.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Trypsin-Varianten

Die Herstellung der katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten erfolgte durch ortsgerichtete Mutagenese mit Hilfe eines QuickChange Site Directed Mutagenesis-Kits der Firma Stratagene nach Weiner *et al.*, (1994). Diese Methode erlaubte durch Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) das gezielte Einfügen von Punktmutationen in die Plasmid-DNA. Der Reaktionsansatz enthielt etwa 50 ng Plasmid-DNA, je 125 ng Primer, 10 pmol dNTP und 2,5 U PfuTurbo DNA-Polymerase in 50 µL des dazugehörigen Reaktionspuffers. Die Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

5 min	95°C	
30 sek	95°C	} 20 Zyklen
60 sek	55°C	
12 min	68°C	
5 min	68°C	

Für die Einführung der Punktmutation Ser195Ala in die Primärstruktur der vier ausgewählten Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten wurden die Oligonukleotide: 5' CAC AGG GCC ACC **TGC** GTC ACC CTG GC 3' als *forward*-Primer und 5' GC CAG GGT GAC **GCA** GGT GGC CCT GTG 3' als *reverse*-Primer verwendet. Im Anschluss an die Mutagenese erfolgte der Abbau des Templates durch 20 U *DpnI* bei 37°C für 60 min. Die korrekte Mutation wurde durch Sequenzierung überprüft (MWG Biotech).

3.2.1.2 Herstellung des Expressionsplasmids für trypsin-spezifisches Eglin C

Die cDNA für trypsin-spezifisches EglinC wurde von der Firma Geneart codon-optimiert synthetisiert: 5' ATGACCGAATTTGGCAGCGAACTGAAAAGCTTTCCGGAAGTGG TGGGCAAACCGTGGATCAGGCGCGTGAATATTTTACCCTGCACTATCCGCA GTACGATGTGTATTTTCTGCCGGAAGGCAGCCCGGTGACCAAAGATCTGCGTT ATAACCGTGTGCGTGTGTTTTACAATCCGGGCACCAACGTGGTGAACCATGTG CCGCATGTGGGCTAATAA 3'. Die Subklonierung der cDNA erfolgte durch Insertion in den pET-15b-TEV Vektor über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *BamHI*. Der korrekte Einbau wurde durch Sequenzierung überprüft (MWG Biotech).

3.2.2 Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Eine Einzelkolonie wurde in 5 mL LB-Medium überführt, für 12 h bei 37°C und 160 rpm kultiviert. Anschließend wurde die Vorkultur in 100 mL LB-Medium aufgenommen, bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert und abgeerntet (5 min, 2500 rpm, 4°C). Das Zellpellet wurde im Anschluss zweimal mit eiskalter CaCl₂-Lösung gewaschen, zentrifugiert und schließlich erneut mit eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert. Der Ansatz wurde 2 h auf Eis inkubiert, im Verhältnis 1:1 mit sterilem 50%-igen w/w Glycerin gemischt und aliquotiert. Die 200 µL Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Chemokompetente Zellen wurden 30 min auf Eis mit 80-100 ng Plasmid inkubiert, für 60 s einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und 2 min auf Eis abgekühlt. Im Anschluss wurde den Transformationsansätzen jeweils 150 µL LB-Medium zugesetzt. Nach 60-minütiger Kultivierungszeit auf dem Schüttler (37°C, 300 rpm) wurden die Transformanten auf LB-Agarplatten mit plasmidspezifischem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht (14-16 h) im Brutraum bei 37°C inkubiert.

3.2.4 Kultivierung und Konservierung der *E. coli*-Kulturen

Für das Herstellen von Übernacht - bzw. Vorkulturen wurde 5 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Glycerinkultur oder Einzelkolonie angeimpft und bei 37°C im Brutraum für 12-16 h bei 160 rpm kultiviert. 800 µL der Übernachtskulturen wurden mit 200 µL sterilem 87%-igen w/w Glycerin gemischt, mit flüssigen N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.5 Plasmidpräparation

Plasmid-DNA wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits der Firma Qiagen aus *E. coli* entsprechend der Herstellerangaben isoliert. Die Plasmid-Präparation beruht dabei auf der alkalischen Lyse der *E. coli*-Zellen und der sich anschließenden Adsorption der DNA an eine Silikatmatrix unter hoher Salzkonzentration.

3.2.6 Restriktionsverdau

Doppelsträngige DNA (Plasmide oder PCR-Produkte) wurde nach Bedarf mit 10-20 U Restriktionsendonuklease pro μg DNA unter den vom Hersteller angegebenen Inkubationsbedingungen verdaut (geschnitten).

3.2.7 Elektrophoretische Trennung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden in Agarosegelen in horizontalen Elektrophoresekammern mit 120 V elektrophoretisch getrennt. Die Gele enthielten 1-2% w/v Agarose und 1 $\mu\text{g/mL}$ Ethidiumbromid in Elektrophoresepuffer. Die DNA-Detektion erfolgte unter UV-Licht.

3.2.8 Ligation

Die DNA-Fragmente wurden in geeignet geschnittene Plasmidvektoren ligiert. Die Ligationsansätze enthielten 50 ng Plasmidvektor, das DNA-Fragment im 3- bis 4-fachen molaren Überschuss und 1 U T4-DNA-Ligase in 20 μL des dazugehörigen Reaktionspuffers. Die Reaktionsdauer betrug 18 h bei 14°C.

3.3 Proteinchemische Methoden

3.3.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte über den aus der Primärstruktur berechneten molaren Extinktionskoeffizienten bei 280 nm (ProtParam: Gasteiger *et al.*, 2005). Der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{280\text{nm}}$, für die Trypsin-Varianten betrug 37600 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ und für trypsin-spezifisches Eglin C 8940 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Die Massenkonzentration c_m [mg/mL], setzt sich aus dem Molekulargewicht der Proteine M_w [g/mol], dem molaren Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{280\text{nm}}$, der Küvettenschichtdicke d [cm] und der gemessenen Extinktion $E_{280\text{nm}}$ [AU] zusammen:

$$c_m = \left(\frac{E_{280\text{nm}}}{\epsilon_{280\text{nm}} d} \right) M_w$$

Gleichung 10

3.3.2 Elektrophoretische Trennung und Analyse von Proteinen

Proteine wurden unter denaturierenden Bedingungen in pH-diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch getrennt (*SDS-PAGE*). Durch Anlegen eines elektrischen Feldes konnten die hitzedenaturierten, reduzierten und durch SDS stark negativ geladenen Proteine ihrer Größe nach getrennt werden. Für die elektrophoretische Trennung von Proteinen wurden zwei unterschiedliche Systeme verwendet. Für die Analyse der Trypsin-Varianten wurde die Methode nach Laemmli, 1970, angewendet, für trypsin-spezifisches Eglin C hingegen die Tris/Tricine-Elektrophorese nach *Shaggar* and von Jagow, 1987. Tris/Tricin-Gele verbessern die Auflösung von Proteinen im niedermolekularen Bereich bei hoher Bandenschärfe.

Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit 15-30 mA pro Gel in einer Vertikalapparatur, mit einer Laufzeit von 75 min für Laemmli und 210 min für die sogenannten Shägger-Gele. Die aufgetrennten Proteine wurden mit Silber oder Brilliant Blau R250 gefärbt und nachgewiesen.

3.3.3 Expression der Trypsin-Varianten

Für die Expression im Schüttelkolben wurden viermal 1,5 L LB-Medium, die 100 µg/mL Ampicillin und 50 µg/mL Chloramphenicol enthielten, mit einer Übernachtskultur von transformierter *E. coli* BL21(DE3) pLysS-Zellen 1:100 angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 vermehrt und die Expression der Zielproteine mit 1 mM IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen 15 min mit 6000 rpm pelletiert und bei -20°C eingefroren. Sämtliche Trypsin-Varianten wurden als Trypsinogene überexprimiert und fielen als unlösliches Protein in Form von *Inclusion Bodies* an.

3.3.4 Isolierung und Solubilisierung von *Inclusion Bodies*

Die Isolierung und Solubilisierung der *Inclusion Bodies* (IBs) erfolgte nach Vorschriften von Rudolph *et al.*, 1997.

Das Zellpellet wurde aufgetaut und in 4 mL IB-I-Puffer pro g Feuchtgewicht mittels Ultraturrax resuspendiert. Die Suspension wurde mit 1,5 mg Lysozym pro g Feuchtgewicht versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte ein dreimaliger Zellaufschluss mittels *French Press* (Hochdruckhomogenisator) bei einem Druck von ca. 1200 bar. Genomische DNA wurde durch Zusatz von 10 µg/mL DNaseI und 3 mM MgCl₂ abgebaut. Die unlöslichen Bestandteile wurden für 20 min bei 4°C mit

25000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde mit einem Volumen IB-I - und einem halben Volumen IB-II-Puffer resuspendiert und 30 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden für 20 min bei 4°C mit 25000 rpm pelletiert. Es folgte ein Aufschließen des Pellets in 40 mL IB-IIA-Puffer für 30 min bei 4°C unter Rühren. Nach erneuter Zentrifugation (4°C, 25000 rpm) wurde das Pellet viermal mit je 40 mL IB-III-Puffer gewaschen (Zentrifugationsschritte siehe oben). Zur Solubilisierung der *Inclusion Bodies* wurde das resultierende Pellet in 25 mL IB-IIIA-Puffer aufgenommen und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Der pH-Wert der entstandenen Lösung wurde mit 37%-iger Salzsäure auf pH 3,5 abgesenkt. Das Solubilisat wurde im Anschluss viermal gegen je 500 mL IB-IV-Puffer bei 7°C dialysiert und anschließend 30 min mit 25000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.3.5 Renaturierung der Trypsin-Varianten

Die Renaturierung der solubilisierten, denaturierten Trypsin-Varianten erfolgte nach einer modifizierten Vorschrift von Rudolph *et al.*, (1996) bzw. Rauh *et al.*, (2002) bei 7°C durch Puls-Renaturierung in einem 2 L-Rückfaltungsreaktor.

Die IBs wurden auf eine Konzentration von 4 mg/mL eingestellt und in zehn Pulsen zu je 10 µg/mL, im zwölfstündigen Abstand, zum Renaturierungspuffer gegeben. Stickstoffbegasung verhinderte die Oxidation des Thiol-Redox-Systems (GSH/GSSG) durch Luftsauerstoff. Im Anschluss wurde der Renaturierungsansatz mittels Cross-Flow-Filtration (MWCO 10000 Da) auf ein Zehntel des Volumens eingengt und dreimal gegen je 2 L Tris-Acetat-Puffer dialysiert. Das ausgefallene Material wurde bei 30 min mit 25000 rpm abzentrifugiert.

3.3.6 Aktivierung der Trypsin-Varianten

Die renaturierte und konzentrierte Proteinlösung wurde vor der affinitätschromatographischen Aufreinigung vorsichtig mit NaOH auf einen pH-Wert von 6,5 titriert und mit 125 ng/µL Enterokinase (Enteropeptidase, E.C. 3.4.21.9) über Nacht im Kühlraum unter Rühren enzymatisch prozessiert. Dabei wurde die N-terminale Prosequenz des Trypsinogens (links der als Pfeil dargestellten Schnittstelle) verdaut und die Trypsin-Varianten freigesetzt.



3.3.7 Reinigung der Trypsin-Varianten an SBTI-Agarose

Das Prinzip der Affinitätschromatographischen Reinigung von Proteinen beruht auf einer reversiblen Interaktion des zu reinigenden Proteins mit einem spezifischen Liganden, der an dem Säulenmaterial immobilisiert ist. Die Methode ermöglicht eine Auftrennung mit hoher Kapazität, hoher Selektivität und daher hoher Auflösung.

Für die Reinigung der enzymatisch prozessierten Trypsin-Varianten wurde eine XK 16-Säule mit kommerzieller SBTI-Agarose gepackt. Die Säule wurde mit fünf Säulenvolumen (SV) SBTI-I-Puffer äquilibriert und die Proteinlösung mit einer 100 mL Probenauftragsschleife und einer Flussrate von 1 mL/min (Maximaldruck 0,15 bar) aufgetragen. Anschließend wurde mit ebenfalls fünf Säulenvolumen SBTI-II-Puffer gewaschen. Durch Absenkung des pH-Wertes wurde das Protein mit 2 Säulenvolumen SBTI-III-Puffer eluiert. Das Eluat (10-15 mL) wurde anschließend mittels Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra MWCO 5000 Da) bei 4°C konzentriert und gegen Trypsin-Lagerlösung umgepuffert.

3.3.8 Expression von trypsin-spezifischem Eglin C

Im Gegensatz zu den Trypsin-Varianten ließ sich trypsin-spezifisches Eglin C in löslicher Form exprimieren. Für die Expression im Schüttelkolben wurden viermal 1,5 L LB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin versetzt und mit einer Übernachtskultur von transformierter *E. coli* BL21(DE3)-Zellen 1:100 angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3 bei 37°C vermehrt. Danach wurde die Temperatur auf 30°C gesenkt und die Expression des Zielproteins bei einer OD₆₀₀ von 0,8 mit 1 mM IPTG induziert. Nach vier Stunden wurden die Zellen 15 min mit 6000 rpm pelletiert und bei -20°C eingefroren.

3.3.9 Reinigung von trypsin-spezifischem Eglin C an Ni-NTA-Agarose

Für die Reinigung von löslich exprimierten, trypsin-spezifischem Eglin C wurde das Zellpellet zunächst aufgetaut und in 4 mL Ni-NTA-I-Puffer pro g Feuchtgewicht mittels Ultraturrax resuspendiert. Die Suspension wurde mit 1,5 mg Lysozym pro g Feuchtgewicht, 10 µg/mL DNaseI und 3 mM MgCl₂ versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden nachfolgend mittels *French Press* bei einem Druck von ca. 1200 bar aufgeschlossen und für 20 min bei 4°C mit 25000 rpm pelletiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit einer 50 mL-Probenauftragsschleife und einer

Flussrate von 2 mL/min auf eine 5 mL-HisTrap Crude-Säule aufgetragen, die zuvor mit 5 Säulenvolumen Ni-NTA-I-Puffer äquilibriert worden war. Durch einen linearen Gradienten von 0% auf 100% Ni-NTA-II-Puffer über 20 Säulenvolumen wurde das Zielprotein eluiert. Zur Abspaltung des N-terminalen (His)₆-tags wurde die Proteinlösung dreimal gegen 500 mL TEV-Spaltpuffer dialysiert, mit 1 μM TEV-Protease (Van den Berg *et al.*, 2005) über Nacht bei 4°C inkubiert und dreimal gegen 500 mL Ni-NTA-I-Puffer dialysiert. Ausgefallenes Material wurde 25 min bei 25000 rpm abzentrifugiert. Das Dialysat wurde mit einer 50 mL-Probenauftragsschleife und einer Flussrate von 1 mL/min auf eine, mit 5 Säulenvolumen Ni-NTA-I-Puffer äquilibrierte, 5 mL-HisTrap HP-Säule aufgetragen und das Zielprotein im Durchfluss gesammelt. Mittels Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra MWCO 3500 Da) wurde der Durchfluss konzentriert und in ITC- bzw. S75-Puffer mittels Dialyse umgepuffert.

3.4 Faktor Xa-Inhibitionsassay

Die Messungen wurden in einem Plattenlesegerät VERSAMax (Molecular Devices) im 96-well Format bei 37°C durchgeführt. Für einen 100 μL Messansatz wurden 5 μL einer 1 μg/mL Enzymlösung (bovines Trypsin bzw. boviner Faktor Xa), 40 μL einer Lösung von 6,34 mg/mL trypsin-spezifischem Eglin C-, 10 μL einer 400 μM Substratlösung und 45 μL Assay-Puffer (siehe Kapitel 3.1.7) eingesetzt. Der Ansatz wurde ohne Substrat für 10 min bei 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe des chromogenen Substrates wurde der Anstieg über 20 min bei einer Wellenlänge von 405 nm verfolgt (Aurell *et al.*, 1977).

3.5 Kalorimetrie

3.5.1 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die dynamische Differenzkalorimetrie (engl. *Dynamic Scanning Calorimetry*) dient der Untersuchung der thermischen Denaturierung von Proteinen in Lösung. Während der thermischen Denaturierung wird ein Wärmestrom in die oder aus der Probe im Vergleich zu einer Referenzprobe (Puffer) gemessen. Ein dafür verwendetes Kompensations-Differenzkalorimeter besteht aus einem Paar Messzellen, die sich in einer adiabatischen Kammer befinden (Abb. 19). Während der Messung wird die Kammer kontrolliert erhitzt und die elektrische Heizleistung, die nötig ist, um dabei eventuell auftretende Temperaturunterschiede zwischen der Proben- und Referenzzelle auszugleichen, gemessen. Wenn die Lösungen in beiden Messzellen gleich sind, ist auch der

Wärmestrom für beide identisch; die Wärmestromdifferenz ist dann gleich null. Wenn sich die Probe während der Messung verändert, indem sie z.B. denaturiert, wird dabei entweder Wärme abgegeben (exotherm) oder aufgenommen (endotherm) und die Wärmeströme für Probe und Referenz unterscheiden sich. Die Veränderung der spezifischen Wärmekapazität der Probe ergibt sich direkt aus der durch das *Feedback* hinzu - bzw. abgeführten Energie (in Form von elektrischer Leistung). Diese in Joule/Minute gemessene Größe kann durch das Verrechnen der Messrate (typischerweise 1 bis 1,5 K/min) und die Konzentration der Probelösung in die Wärmekapazität C_p (gemessen in J/(K mol)) umgerechnet werden.

Die thermischen Denaturierungsexperimente wurden in einem VP-DSC Mikrokalorimetersystem (Microcal LLC) in den DSC-Puffern-1-5 (siehe Kapitel 3.1.7) durchgeführt. Dafür wurden die Proteinlösungen zunächst in 1 mL-Dialyseknöpfen für 18 h bei 4°C gegen den jeweiligen DSC-Puffer dialysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 14000 rpm) wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt und die Proteinproben auf eine Konzentration von 5 - 35 µM in einem Volumen von 2,5 mL eingestellt. Vor den Messungen wurden die Proben und der Puffer unter Rühren für 10-15 min bei 25°C entgast. Für alle Messungen wurde eine Temperaturrampe zwischen 20°C und 80°C mit einer Heizrate von 1,5 K/min gefahren. Um die Reversibilität der beobachteten Denaturierungsübergänge zu überprüfen, wurden die Scans mindestens einmal wiederholt. Die gemessenen Kurven wurden durch Subtraktion der unmittelbar vor der Messung bestimmten Pufferbasislinie korrigiert und auf die eingesetzte Stoffmenge an Protein normiert.

Für die Auswertung wurden die Kurven mit Hilfe der im *Software*-Paket Origin 7.0 für DSC (Microcal LLC) implementierten Routinen basislinienkorrigiert. An die erhaltenen modifizierten Messkurven wurden mit Hilfe des nicht-linearen Kurvenanpassungsmoduls des Programms theoretische Kurven nach dem *non-two-state* Modell (DSC Data Analysis in Origin - Tutorial Guide, Microcal LLC, S. 91) angepasst und damit apparente Übergangstemperaturen T_m ermittelt.

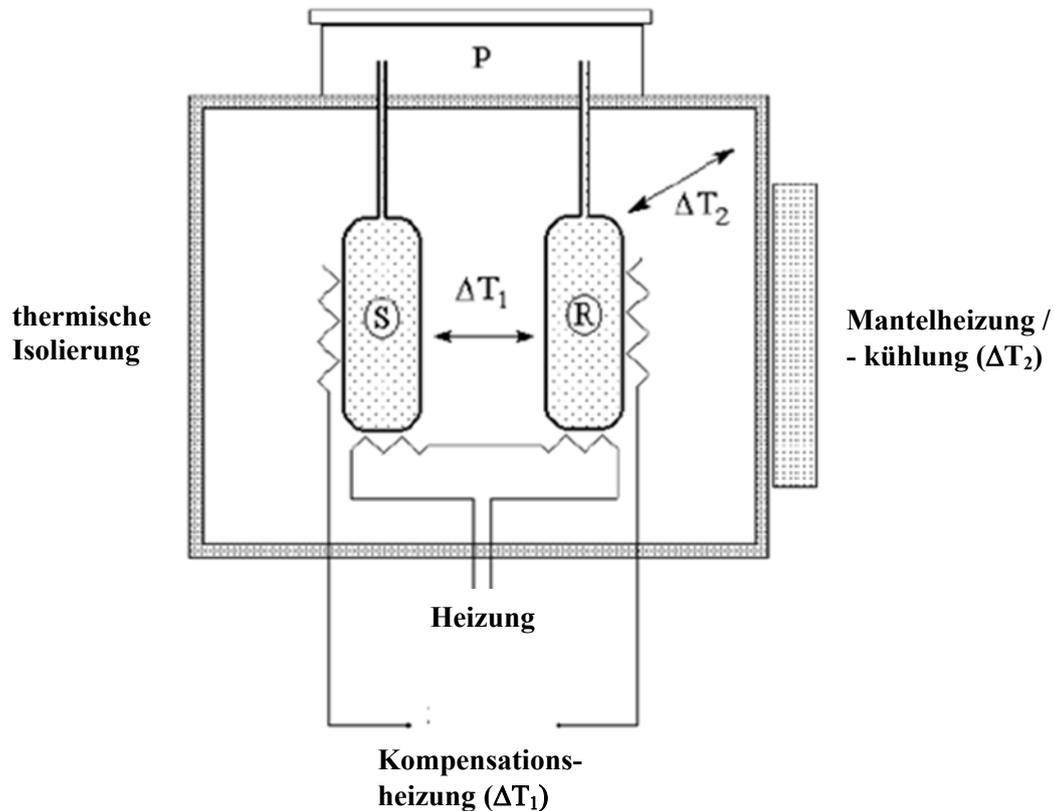


Abb. 19: Schematischer Aufbau eines Kompensationskalorimeters (Quelle: Cooper *et al.*, 2000). Die Proben- (S) und Referenzzelle (R), die ein identisches Volumen zwischen 0,5 mL und 2 mL aufweisen, werden vollständig mit Proteinlösung bzw. Puffer befüllt. Dabei wird mit Luft oder einem Schutzgas ein Überdruck (P) angelegt, um eine mögliche Blasenbildung beim Erhitzen der Proben zu unterdrücken. Bei der Durchführung eines Experiments wird die Temperatur der Messanordnung über die Mantelheizung/-kühlung gleichmäßig erhöht bzw. erniedrigt, während die Temperaturdifferenzen zwischen Proben- und Referenzzelle (ΔT_1) und zwischen den Zellen und dem umgebenden adiabatischen Mantel (ΔT_2) ständig überwacht werden. Die Regelung der Mantelheizung erlaubt eine gleichmäßige Führung der Temperatur der Messzellen, während durch die Regelung der Kompensationsheizung jeder Temperaturunterschied zwischen den Zellen, der während des Experiments auftritt, ausgeglichen wird. Die dafür nötige Kompensationsleistung wird vom DSC-Gerät gemessen.

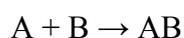
3.5.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Methode der isothermen Titrationskalorimetrie (engl. *Isothermal Titration Calorimetry*) ermöglicht sehr zuverlässige quantitative Aussagen zu Protein-Ligand-Bindungsgleichgewichten. Das ITC-Instrument misst direkt die Wärmemengen, die bei der Titration eines Bindungspartners, z.B. eines Proteins, mit seinem Liganden freigesetzt werden (Pierce *et al.*, 1999). So kann aus einem ITC-Experiment die Reaktionsenthalpie der untersuchten Wechselwirkung, ΔH_R , direkt bestimmt werden. Im Allgemeinen werden für die ITC Gleichgewichtstitrationen durchgeführt, d.h. nach Zugabe einer

kleinen Menge Ligand wird solange gewartet, bis das dadurch perturbierte Gleichgewicht wieder eingestellt ist. Die bei der Wiedereinstellung des Reaktionsgleichgewichts freigesetzten Wärmemengen Δq ergeben sich dabei als Produkt aus Stoffumsatz und Reaktionsenthalpie ΔH_R . Zusätzlich werden die Wärmebilanzen eventuell ablaufender Nebenreaktionen, wie z.B. der Verdünnung des Liganden in den Puffer sowie der Protonierung/Deprotonierung von Puffersalzen mit erfasst; diese Störsignale müssen gegebenenfalls durch geeignete Kontrollexperimente bestimmt und bei der Auswertung der Daten korrigiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Messmethode der ITC zur Untersuchung der Interaktion zwischen Trypsin-Varianten und trypsin-spezifischem Eglin C verwendet. Die Titrationsexperimente wurden mit einem VP-ITC Mikrokolorimeter (Microcal LLC) bei 25°C im ITC-Puffer (siehe Kapitel 3.1.7) durchgeführt (Abb. 19). Protein- und Ligandlösungen wurden für 18 h bei 4°C gegen ITC-Puffer dialysiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (15 min, 14000 rpm) wurde die Proteinkonzentration photometrisch bestimmt und die Proteinproben auf eine Konzentration von 7-10 μM in einem Volumen von 2 mL eingestellt. Der Ligand wurde zehnfach konzentrierter in einem Volumen von 1 mL angesetzt. Vor den Messungen wurden die Proben für 10 min bei 24°C unter Rühren entgast. Das Proteinvolumen in der Messzelle betrug 1,4 mL, das des Liganden im Titrationsaufsatz 350 μL . Pro Messung wurden 24 Injektionen, zu je 12 μL Ligand, in die Messzelle durchgeführt. Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Injektionen betrug 420 sec.

Um die thermodynamischen Parameter der Bindung zu erhalten, wurden die Titrationsdaten mittels des Programms Origin 7.0 für ITC (MicroCal LLC) ausgewertet. Für die Analyse der Daten wurde dabei das fest implementierte Bindungsmodell mit einem Typ unabhängiger Bindungsstellen verwendet (*one set of sites*). Damit wurde der Auswertung die Annahme zu Grunde gelegt, dass die Eglin C-Mutante-L45K und die Trypsin-Varianten einwertige bimolekulare Komplexe entsprechend der Reaktionsgleichung bilden.



Gleichung 11

Der Massenwirkungsbruch Ξ dieser einfachen Bindungsreaktion hat die Form

$$\Xi = \frac{[\text{AB}]}{[\text{A}][\text{B}]} \quad \text{Gleichung 12}$$

wenn vereinfachend die Aktivitäten der Spezies mit ihren freien Konzentrationen, $[\text{X}]$, gleichgesetzt werden. Im Gleichgewicht wird Ξ zur Assoziationsgleichgewichtskonstante K_A . Bei festen Ausgangskonzentrationen $[\text{A}]_0$ und $[\text{B}]_0$ gilt wegen der Bedingung der Massenerhaltung

$$K_A = \frac{[\text{AB}]}{([\text{A}]_0 - [\text{AB}])([\text{B}]_0 - [\text{AB}])} \quad \text{Gleichung 13}$$

mit der Lösung

$$[\text{AB}] = \frac{1}{2} \left([\text{A}]_0 + [\text{B}]_0 + \frac{1}{K_A} \right) - \sqrt{\frac{\left([\text{A}]_0 + [\text{B}]_0 + \frac{1}{K_A} \right)^2}{4} - [\text{A}]_0 [\text{B}]_0} \quad \text{Gleichung 14}$$

Bei Änderung $\delta[\text{B}]_0$ der Gesamtkonzentration des zutitrierten Bindungspartners ergibt sich dann für die durch diese Perturbation hervorgerufene Veränderung $\delta[\text{AB}]$ der freien Komplexkonzentration

$$\frac{\delta[\text{AB}]}{\delta[\text{B}]_0} = \frac{1}{2} - \frac{\left(\frac{1}{K_A} + [\text{B}]_0 - [\text{A}]_0 \right)}{4 \sqrt{\frac{\left([\text{A}]_0 + [\text{B}]_0 + \frac{1}{K_A} \right)^2}{4} - [\text{A}]_0 [\text{B}]_0}} \quad \text{Gleichung 15}$$

Die Form der durch die Gleichungen 14 und 15 beschriebenen Titrationskurven ist in Abb. 20 dargestellt. Die Wärmemenge Δq , die bei der Titration im ITC nach Zugabe einer bestimmten Menge an Ligand freigesetzt wird, ergibt sich danach aus dem Stoffumsatz nach Änderung der Gesamtkonzentration $\Delta[\text{B}]_0$ des Liganden im Reaktionsvolumen V und aus der Bindungsenthalpie ΔH_B^0 der untersuchten Reaktion in guter Näherung als

$$\Delta q = \Delta H_B^0 \left(\frac{\delta[AB]}{\delta[B]_0} \right)_{[A]_0, [B]_0} \Delta[B]_0 \quad \text{V} \quad \text{Gleichung 16}$$

Mit Hilfe der Gleichungen 15 und 16 lassen sich aus den bei der Durchführung des ITC-Experimentes gemessenen Daten (siehe Abb. 43 im Ergebnisteil) durch nicht-lineare Kurvenanpassung die Assoziationsgleichgewichtskonstante K_A sowie die Bindungsenthalpie ΔH_B^0 der Komplexbildung bestimmen.

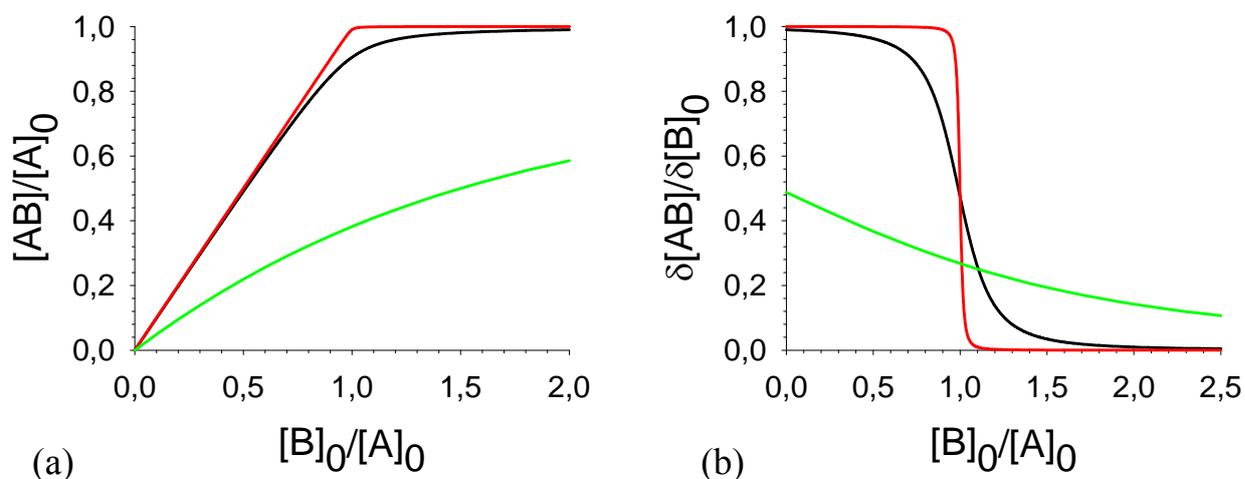


Abb. 20: Theoretische Titrationskurve für eine einfache Bindungsreaktion $A + B \rightarrow AB$. Die Kurven wurden unter der Voraussetzung berechnet, dass Bindungspartner A in der konstanten Gesamtkonzentration $[A]_0$ vorgelegt wird, während die Gesamtkonzentration $[B]_0$ des Bindungspartners B durch die Titration variiert wird. Dargestellt ist (a) die relative Konzentration des gebildeten Komplexes und (b) der Reaktionsumsatz pro Änderung $\delta[B]_0$ der Gesamtkonzentration des Bindungspartners B. Die bei der ITC gemessenen Wärmesignale sind proportional zu dem in (b) dargestellten Reaktionsumsatz.

3.6 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

In einem NMR-Experiment untersucht man eine hochzentrierte Proteinlösung (wobei das Protein oftmals noch mittels ^{13}C oder ^{15}N markiert sein muss) und setzt diese Lösung einem starken Magnetfeld aus. Der Magnetisierungszustand der magnetisch aktiven Kerne ^1H , ^{13}C , ^{15}N etc. gibt dann einen Hinweis auf die dreidimensionale Struktur des untersuchten Proteins. Im Verlauf der Arbeit wurden ^{15}N - und ^{13}C -, ^{15}N -markierte Trypsin-Varianten für NMR-spektroskopische Untersuchungen hergestellt. Die Aufnahme und Analyse der NMR-Spektren erfolgte in Kooperation mit Dr. Elizabeth Dowler und Prof. Dr. Hartmut Oschkinat vom FMP in Berlin-Buch.

3.6.1 Probenvorbereitung

Die Expression der ^{15}N - und ^{13}C -, ^{15}N - markierten Proben erfolgte wie in Kapitel 3.3.3 beschrieben. Für die Kultivierung der Zellen wurde M9-Minimalmedium (siehe Kapitel 3.1.4) verwendet. Zellen, die deuteriertes, ^{13}C -, ^{15}N - markiertes, inaktives bovines Trypsin exprimieren, wurden freundlicherweise von Dr. Anne Diehl, FMP Berlin-Buch, im 250 mL Fermenter gezüchtet und zur Verfügung gestellt. Die Isolierung und Reinigung der markierten Proteinproben erfolgte analog zu den unmarkierten. Die banden-reinen Proteine wurden gegen NMR-Puffer in Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra MWCO 5000 Da) umgepuffert und auf eine Proteinkonzentration von mindestens 100 μM eingestellt.

3.6.2 Datenaufnahme und Analyse

Die Proteinproben wurden unmittelbar vor Aufnahme der HSQC-Spektren mit D_2O versetzt und in NMR-Röhrchen gefüllt. Deuteriertes Wasser verhinderte ebenso wie deuteriertes Acetat im NMR-Puffer die Überlagerung der Resonanzen mit den Protonensignalen der Pufferbestandteile. Die NMR-Messungen wurden bei einer Temperatur von 27°C mit einem Bruker DMX 600 bzw. 750 Spektrometer durchgeführt. Das Programm XWinNMR (XWinNMR processing manual) wurde verwendet, um die Daten zu prozessieren. Zur Datenbearbeitung, also Resonanzzuordnung, wurde das Programm Sparky (Goddard & Kneller) verwendet.

3.7 Röntgenstrukturanalyse

Für eine Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie muss das Protein kristallisiert werden. Das heißt, man benötigt dreidimensionale Kristalle mit einem so hohen Ordnungsgrad, dass Röntgenstrahlung (elektromagnetische Strahlung mit Wellenlängen im Bereich von 10^{-10} m) zu möglichst hoher Auflösung gestreut wird. Aus den gemessenen Streudaten kann man dann die dreidimensionale Struktur der im Kristall befindlichen Moleküle berechnen. Da die Röntgenstrukturanalyse den wesentlichen Teil dieser Arbeit einnimmt, werden die einzelnen Schritte einer Röntgenstrukturanalyse in Kapitel 2 im Detail besprochen.

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Proteinkomplexe aus einer Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K kristallisiert und strukturell gelöst.

3.7.1 Herstellung der Proteinkomplexe

Zur Kristallisation wurde ein homogener Komplex der Stöchiometrie 1:1 zwischen einer Trypsin-Variante und trypsin-spezifischem Eglin C angestrebt. Durch Gelfiltration wurde überprüft, ob sich solch ein Komplex zwischen der Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K ausbildet.

Dazu wurden je eine gereinigte Trypsin-Variante und die (His)₆-tag-freie, gereinigte Eglin C-Mutante-L45K mittels Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra MWCO 3500-, 5000 Da) in S75-Puffer umgepuffert. Beide Komponenten wurden in einem Volumen von 3-4 mL gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Eglin C-Mutante-L45K wurde im 10-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Das Proteingemisch wurde auf eine Hi Load-26/60-Superdex 75 aufgetragen und der Lauf mit einer Flussrate von 1 mL/min durchgeführt. Der Komplex konnte mit einer Retentionszeit von 180 min gewonnen werden. Überschüssiges, ungebundenes Eglin C-L45K eluierte mit einer Retentionszeit von 210 min. Die Konzentration des Komplexes wurde im Anschluss photometrisch bestimmt und die Lösung für Kristallisationsexperimente mittels Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra MWCO 5000 Da) in S75-Dialysepuffer umgepuffert.

3.7.2 Kristallisation

Die gereinigten Komplexe wurden mit Zentrifugen-Filtereinheiten (Amicon Ultra MWCO 5000 Da) auf eine Proteinkonzentration von 4,5 mg/mL aufkonzentriert. Die Proteinlösungen wurden vor dem Auftrag auf die Deckgläschen für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Für den Kristallisationsansatz *Triple-Glu-Ala* – Eglin C-L45K wurde ein *Screening* der Standardkristallisationscocktails *Sigma Cryo Kit*, *Sigma Basic Kit*, *Jena Bioscience 1-10*, *Hampton Research* und *Home Factorial Solutions* (genaue Zusammensetzung s. Herstellerangaben) mit Hilfe eines Pipettierroboters (Cartesian) durchgeführt. Dazu wurden Kristallisationspuffer in 96-well Platten mit 96 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen pipettiert, 200 nL Proteinlösung mit 200 nL Reservoirlösung gemischt und nach der Methode des ‚Sitzenden Tropfens‘ für 10 Tage bei 10 °C inkubiert.

Die Kristallisation der restlichen Komplexe aus einer Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K erfolgte nach der Hängetrophenmethode. Dazu wurden in das Reservoir der 24-well EasyXtal Tool™ Kristallisationsplatten 500 µL Kristallisationspuffer

(18% w/v PEG 10 000, 20 % w/v Glycerin, 100 mM Tris/HCl pH 8,5/9,0, 100 mM NaCl) vorgelegt. 2 μ L der jeweiligen Komplexlösung wurden mit 2 μ L Reserviörlösung auf Schraubgläschen vermischt, welche im Anschluss umgedreht und luftdicht verschlossen wurden, so dass der Tropfen auf der Unterseite des Deckels hing. Die Platten wurden bei 10°C gelagert.

3.7.3 Datensammlung

Alle Kristalle wurden im Stickstoffstrahl bei -180°C vermessen. Als Gefrierschutzmittel dienten 20 % v/v Glycerin im Kristallisationspuffer. In diesem Gefrierschutz-Puffer wurden die Kristalle kurz eingetaucht, bevor sie auf dem Goniometerkopf im Stickstoffstrahl montiert wurden. Die Kristalle wurden im Haus mit monochromatischer CuK α -Röntgenstrahlung ($\lambda = 1.54182 \text{ \AA}$) eines Drehanoden-Röntgengenerators der Firma Rigaku (MicroMax 007, RigakuMSC Tokio, Japan, max. Leistung: 40 kV, 20 mA) vermessen. Die Detektion erfolgte auf einer Imaging Plate (Rigaku R-AxisVI++, Tokio, Japan). Die Datensätze wurden als eine Serie von Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkelinkrement von $\Delta\phi = 0.5^\circ$ aufgenommen. Für jede Einzelaufnahme wurde der Kristall 30-60 sek lang belichtet.

Weiterhin wurden Datensätze in Synchrotron-Strahlungslaboren am Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) in Hamburg, EMBL-Beamline X12, und am Helmholtz-Zentrum Berlin (HZB), BESSY II, Messeinrichtung BL14-1, gemessen.

3.7.4 Datenprozessierung

Die Prozessierung der Rohdaten erfolgte mit den Programmpaketen XDS/XSCALE (Kabsch, 1993), DENZO/SCALEPACK (Otwinowski & Minor, 1997) oder MOSFLM/SCALA (CCP4, 1994; Leslie, 1992; Evans, 2005).

3.7.5 Strukturlösung und Verfeinerung

Die Strukturen der vier Proteinkomplexe wurden mittels Molekularen Ersatz (MR) gelöst. Als Suchmodelle dienten die PDB-Einträge 1V2L (Rauh *et. al.*, 2004) und 1ACB (Frigerio *et. al.*, 1992). Die gelöste Struktur des Komplexes *Triple-Glu-Ala* - Eglin C-L45K diente im Weiteren als Suchmodell für die drei verbliebenen Strukturen. Die Orientierung und Positionierung der Moleküle erfolgte mit dem Computerprogramm PHASER (McCoy *et al.* 2007). Atomare Modelle wurden mit dem Programm COOT (Emsley & Cowtan, 2004) in die Elektronendichten eingepasst. Sämtliche

Verfeinerungsrechnungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997; CCP4, 1994) durchgeführt. Die mittleren Koordinatenfehler der Strukturen wurden anhand des *diffraction component precision index* DPI (Cruickshank, 1999) ermittelt.

3.7.6 Graphische Darstellung

Das Programm PyMOL Version 0.99 (*DeLano Scientific LLC*) diente der graphischen Wiedergabe der strukturellen Daten.

3.7.7 Analyse und Beschreibung der Strukturen

Bei der Bindung der Eglin C-Mutante-L45K an die verschiedenen Trypsin-Varianten wurden die verborgenen Oberflächen mit Hilfe des PISA-Servers (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) berechnet. Die Kalkulation sämtlicher Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zwischen Eglin C und den Trypsin-Varianten erfolgte auch mit Hilfe des PISA-Servers (Krissinel and Henrick, 2007). Des Weiteren wurde eine Abschätzung der Bindungsenergie ebenfalls mit Hilfe des PISA-Servers durchgeführt.

Zur Überlagerung der Kristallkomplexe und Berechnung der *rmsd*-Werte diente das Programm LSQKAB (CCP4 1994, Kabsch 1976).

4 Ergebnisse

4.1 Die bearbeiteten Proteine und Proteinkomplexe

In der vorliegenden Arbeit wurden vier ausgewählte katalytisch inaktive Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten (*Triple-Ala*, *Triple-Glu-Ala*, *Triple-Phe-Ala*, *Triple-Glu-Phe-Ala*) und trypsin-spezifisches Eglin C rekombinant hergestellt, gereinigt und sowohl thermodynamisch als auch strukturell charakterisiert.

4.1.1 Expression und Reinigung der Trypsin-Varianten

Die in dieser Arbeit untersuchten katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten wurden wie im Methodenteil beschrieben durch zielgerichtete Mutagenese hergestellt. Zu diesem Zweck wurde in der katalytischen Triade der Proteasen ein Aminosäureaustausch vorgenommen und die katalytische Aminosäure Ser195 gegen ein Alanin ersetzt. Für die heterologe Expression der Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten wurde der Stamm *E. coli* BL21(DE3) pLysS gewählt, weil dieser eine hocheffiziente Expression eukaryotischer Proteine unter Kontrolle des T7-Promotors gewährleistet. Das zusätzlich im BL21(DE3) pLysS Stamm enthaltende Plasmid pLysS kodiert für das Gen von T7-Lysozym, welches die Hintergrundexpression des Zielgens unter Kontrolle des T7-Promotors vor der Induktion mit IPTG minimiert (Stanto & Patel, 2004). Die cytoplasmatische Expression der Trypsin-Varianten in dem Stamm BL21(DE3) pLysS führte aufgrund reduzierender Bedingungen im Cytoplasma der Zellen zur inkorrekten Ausbildung der Disulfidbrücken. Die Expression resultierte somit in der Bildung von biologisch inaktiven Proteinaggregaten, die als *Inclusion-Bodies* (IBs) bezeichnet werden. Zur Gewinnung des nativen Proteins aus IBs mussten diese isoliert und anschließend wie im Methodenteil beschrieben renaturiert werden. Das renaturierte Protein wurde im Anschluss durch Enterokinaseverdau aktiviert und die so freigesetzten Trypsin-Varianten auf eine Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor-(SBTI)-Agarose-Säule aufgetragen (Hedstrom *et al.*, 1996). Immobilisierter SBTI diente dabei als spezifischer Bindungspartner für Trypsin, das so von anderen Proteinverunreinigungen und von nicht aktiviertem Trypsinogen abgetrennt werden konnte. Die Elution wurde mit 0,1 M Ameisensäure durchgeführt, indem durch Senkung des pH-Wertes die spezifischen Wechselwirkungen zwischen Trypsin und SBTI abgeschwächt wurden. Die Trypsin-Varianten wurden vollständig in einem definierten und gut abgetrennten Peak von der SBTI-Agarose-Säule

eluiert. Die Eluatfraktionen wiesen in der SDS-Page eine Reinheit von schätzungsweise 98% auf, die als ausreichend für die anschließenden biophysikalischen Charakterisierungen und strukturellen Untersuchungen erachtet wurde (Abb. 21). Die Ausbeuten der einzelnen Schritte für alle hergestellten Varianten sind zusammenfassend in Tab. 3 dargestellt. Die angegebenen Werte stellen Mittelwerte aus den im Laufe der Arbeit durchgeführten Reinigungen dar.

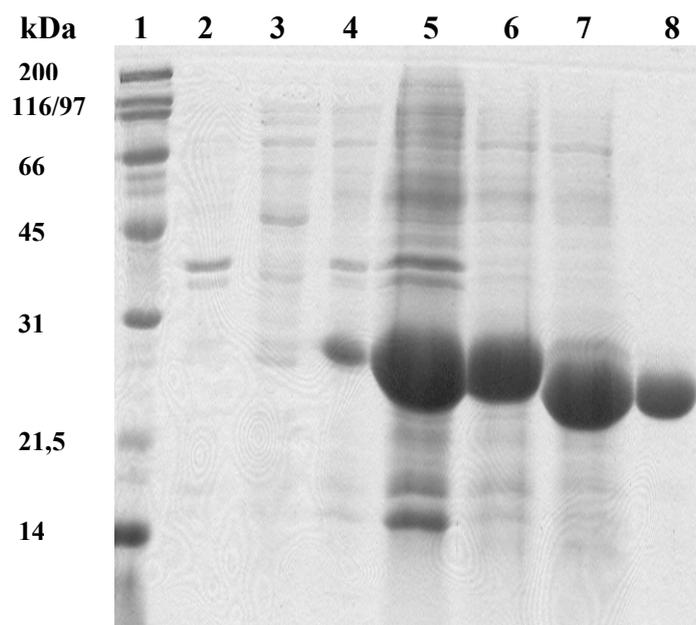


Abb. 21: 15%-ige SDS-PAGE von der Herstellung der Trypsin-Varianten am Beispiel von *Triple-Ala* Trypsin. Folgende Proteinproben sind aufgetragen: Spur 1- Molekulargewichtsstandard mit der Größenangabe der darin enthaltenen Proteine in kDa; Spur 2- Rohextrakt vor der Induktion; Spur 3- lösliche Fraktion des Rohextraktes 4 h nach Induktion; Spur 4- unlösliche Fraktion des Rohextraktes 4 h nach Induktion; Spur 5- solubilisiertes Protein, Spur 6- renaturiertes Protein vor dem Enterokinaseverdau; Spur 7- Proteinprobe nach dem Verdau mit Enterokinase; Spur 8- Eluatfraktion von der SBTI-Agarose-Säule. Das Foto zeigt die Anreicherung der Trypsin-Variante, die im letzten Herstellungsschritt zur Homogenität gereinigt werden konnte.

Tab. 3: Ausbeuten der Trypsin-Varianten.

Protein (unmarkiert & markiert)	g Zellen pro L Kultur	mg isolierte IBs pro L Kultur	mg gereinigtes Protein pro L Kultur
bovines Trypsin Ala ¹⁾	1,8	93,4	2,8
<i>Triple-Ala</i> ¹⁾	2,5	85,2	2,3
<i>Triple-Glu-Ala</i> ¹⁾	1,7	76,2	2,0
<i>Triple-Phe-Ala</i> ¹⁾	2,2	63,2	1,8
<i>Triple-Glu-Phe-Ala</i> ¹⁾	2,1	53,8	1,6

$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ - Triple-Ala ²⁾	2,8	81,6	1,5
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ - Triple-Glu-Ala ²⁾	3,2	68,3	1,6
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ - Triple-Phe-Ala ²⁾	2,5	60,6	0,9
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$ - Triple-Glu-Phe-Ala ²⁾	2,8	78,3	1,4
$^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}, \text{D}_2\text{O}$ - Triple-Ala ³⁾	18,0	400,2	2,7

¹⁾ Die Expression erfolgte im 6 L Maßstab im Schüttelkolben. Die angegebenen Ausbeuten sind Mittelwerte aus 4 Reinigungen.

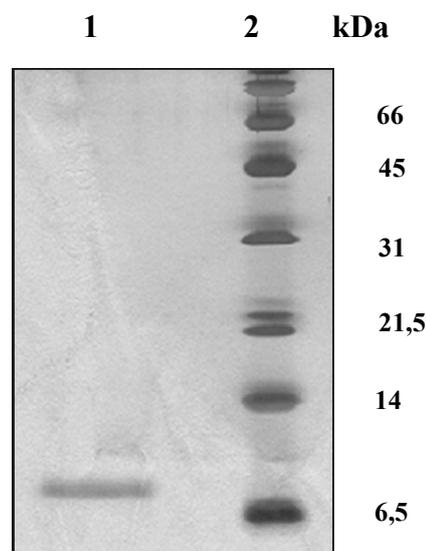
²⁾ Die Expression erfolgte im 3 L Maßstab im Schüttelkolben. Die angegebenen Ausbeuten sind Mittelwerte aus 2 Reinigungen.

³⁾ Die Expression erfolgte viermal im 250 mL Fermenter. Die Zellen wurden im Anschluss vereinigt. Die Probe wurde nur einmal hergestellt.

4.1.2 Expression und Reinigung von trypsin-spezifischem Eglin C

Trypsin-spezifisches Eglin C wurde wie im Methodenteil beschrieben löslich im *E. coli* Stamm BL21(DE3) exprimiert und mit Hilfe des N-terminalen (His)₆-tags mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie von den *E. coli*-eigenen Proteinen getrennt und angereichert. Im Anschluss daran erfolgte die Abspaltung des N-terminalen (His)₆-tags durch eine Inkubation mit TEV-Protease. In einem finalen Ni-NTA-Reinigungsschritt wurde trypsin-spezifisches Eglin C im Durchfluss angereichert und von der TEV-Protease, die ebenfalls einen (His)₆-tag am N-Terminus trägt, abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Zielproteins wurde durch photometrische Ermittlung der Absorption bei 280 nm bestimmt. In Tab. 4 sind die Mittelwerte der Ausbeuten aus sechs Produktionen für die Herstellung von trypsin-spezifischem Eglin C angegeben. Die Abschätzung der Reinheit des hergestellten Eglin C-L45Ks erfolgte mittels Tris/Tricin-basierter SDS-Gelelektrophorese (Abb. 22).

Abb. 22: 16%-ige Tris/Tricine-SDS-PAGE des trypsin-spezifischen Eglin Cs. Auf der ersten Spur ist Eglin C-L45K nach dem finalen Ni-NTA-Reinigungsschritt aufgetragen (1). Die zweite Spur zeigt zum Größenvergleich den Molekulargewichtsstandard (2) in kDa. Das Gel bestätigt, dass die angereicherte Eglin C-L45K-Probe keine signifikanten Verunreinigungen mehr enthielt.



Tab. 4: Ausbeute an trypsin-spezifischem Eglin C. Die Expression erfolgte im 6 L Maßstab im Schüttelkolben. Die angegebene Ausbeute ist der Mittelwert aus 5 im Laufe der Arbeit durchgeführten Reinigungen.

Konstrukt	g Zellen pro L Kultur	mg gereinigtes Protein pro L Kultur
Eglin C-L45K	3,3	7,5

4.2 Röntgenstrukturanalysen

Im folgenden Kapitel wird die Herstellung, Kristallisation und Strukturlösung der einzelnen Komplexe aus den Varianten von Trypsin und der trypsin-spezifischen Eglin C-L45K-Mutante beschrieben.

4.2.1 Herstellung der Proteinkomplexe

Die Grundvoraussetzung für die Durchführung der Kristallisationsexperimente war die Gewinnung eines stöchiometrischen 1:1 Komplexes aus einer katalytisch-inaktiven Trypsin-Variante und trypsin-spezifischem Eglin C. Zu diesem Zweck wurde die Methode der Gelfiltrationschromatographie angewandt. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben. Wie in Abb. 23 am Beispiel des Komplexes aus *Triple-Ala* Trypsin und der Eglin C-Mutante-L45K dargestellt ist, konnte der Proteinkomplex bei einer Flussrate von 1 mL/min mit einer Retentionszeit von 165 min in einem definierten und gut abgetrennten *Peak* von der S75-Säule eluiert werden. Für die Komplexbildung im Überschuss eingesetztes Eglin C-L45K eluierte nach ungefähr 215 min.

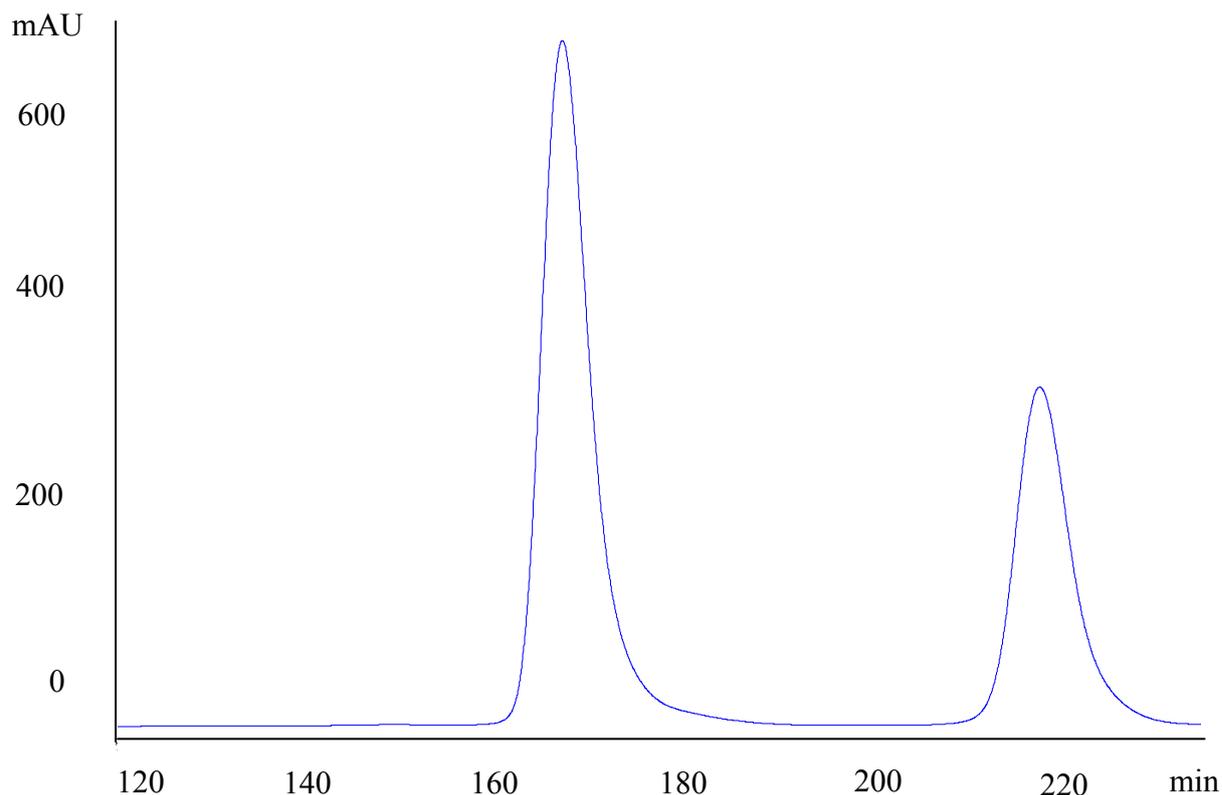
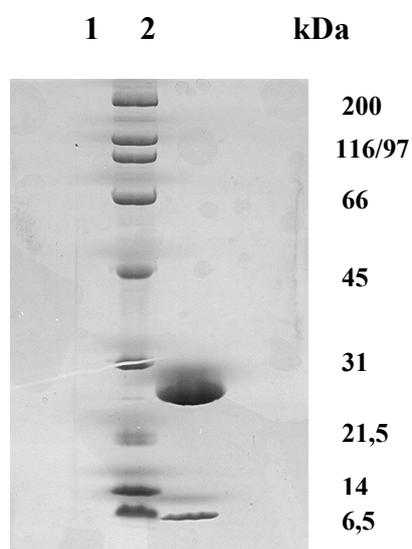


Abb. 23: Charakteristisches Laufprofil eines Komplexes aus *Triple-Ala* Trypsin und trypsin-spezifischem Eglin C. Die Flussrate betrug 1 mL/min. Die UV-Absorption bei 280 nm ist gegen die Retentionszeit aufgetragen. Das Elutionsprofil weist 2 gut definierte und voneinander klar getrennte *Peaks* auf. Mit einer Retentionszeit von etwa 165 min wurde der Komplex eluiert. Überschüssiges Eglin C-L45K eluierte mit einer Retentionszeit von etwa 215 min.

Mittels SDS-PAGE konnte zum einen das Vorhandensein beider Proteinspezies in dem Elutionspeak des Proteinkomplexes bestätigt und zum anderen die hohe Reinheit der Proteinprobe nachgewiesen werden (Abb. 24).

Abb. 24: 15%-ige SDS-PAGE von dem Eluat des Gelfiltrationslaufes des Komplexes aus *Triple-Ala* Trypsin und trypsin-spezifischem Eglin C. Das Foto zeigt den Molekulargewichtsstandard (mit der Größenangabe der darin enthaltenen Proteine in kDa) auf Spur 1 und das Eluat, welches die Trypsin-Variante (25 kDa) und die Eglin C-Mutante (8 kDa) enthielt, auf Spur 2.



Die Ausbeuten der einzelnen Komplexe werden in Tab. 5 einander gegenübergestellt. Der Übersichtlichkeit halber werden die Proteinkomplexe von nun an folgendermaßen abgekürzt: *TA-E*, *TGA-E*, *TPA-E* und *TGPA-E* (Tab. 5).

Tab. 5: Ausbeuten der Proteinkomplexe aus den jeweiligen Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante L45K.

	Proteinkomplex	mg gereinigter Komplex pro mL
<i>TA-E</i>	<i>Triple-Ala - Eglin C</i>	5,94
<i>TGA-E</i>	<i>Triple-Glu-Ala - Eglin C</i>	4,53
<i>TPA-E</i>	<i>Triple-Phe-Ala - Eglin C</i>	4,35
<i>TGPA-E</i>	<i>Triple-Glu-Phe-Ala - Eglin C</i>	5,07

4.2.2 Kristallisation

Um Bedingungen zu finden, unter denen gut streuende Proteinkristalle erhalten werden konnten, wurde zunächst ein Kristallisationsscreening mit kommerziell erhältlichen Standardkristallisationscocktails (siehe Kapitel 3.7.2) durchgeführt. Das erste *Screening* erfolgte mit der Trypsin-Variante *Triple-Glu-Ala* im Komplex mit Eglin C-L45K (*TGA-E*). Der einzige, gut streuende Proteinkristall, der aus diesem Ansatz hervorging, wuchs über einen Zeitraum von zehn Tagen bei einer Lagertemperatur von 10°C im *Jena Bioscience Screen Classic 5 Nummer D1* Kristallisationspuffer (18 % w/v PEG 10000, 20 % w/v Glycerin, 100 mM Tris-HCl pH 8,5, 100 mM NaCl).

Auf Basis dieser Pufferzusammensetzung erfolgte eine Optimierung der Kristallisationsbedingungen der drei verbleibenden Komplexe aus einer Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K. Der Ansatz *Triple-Glu-Phe-Ala - Eglin C-L45K (TGPA-E)*, kristallisierte nach ungefähr 6 Tagen bei 10°C bei der gleichen Pufferzusammensetzung, allerdings bei einem pH-Wert von 9,0. Gut streuende Proteinkristalle der Ansätze *Triple-Ala - Eglin C-L45K (TA-E)*, und *Triple-Phe-Ala - Eglin C-L45K (TPA-E)*, konnten nach *Cross-Seeding* mit *TGPA-E*-Kristallen mit Hilfe eines Katzenschnurrhaares in der selben Pufferzusammensetzung, aber bei pH 8,5 erhalten werden. Als Kristallisationskeim diente dabei ein zerkleinerter Proteinkristall des Komplexes *TGPA-E*. Aus diesem Ansatz bildeten sich dann innerhalb von 7 Tagen für Röntgenstreuexperimente geeignete Proteinkristalle von Komplex *TA-E* und Komplex *TPA-E* (Abb. 25).

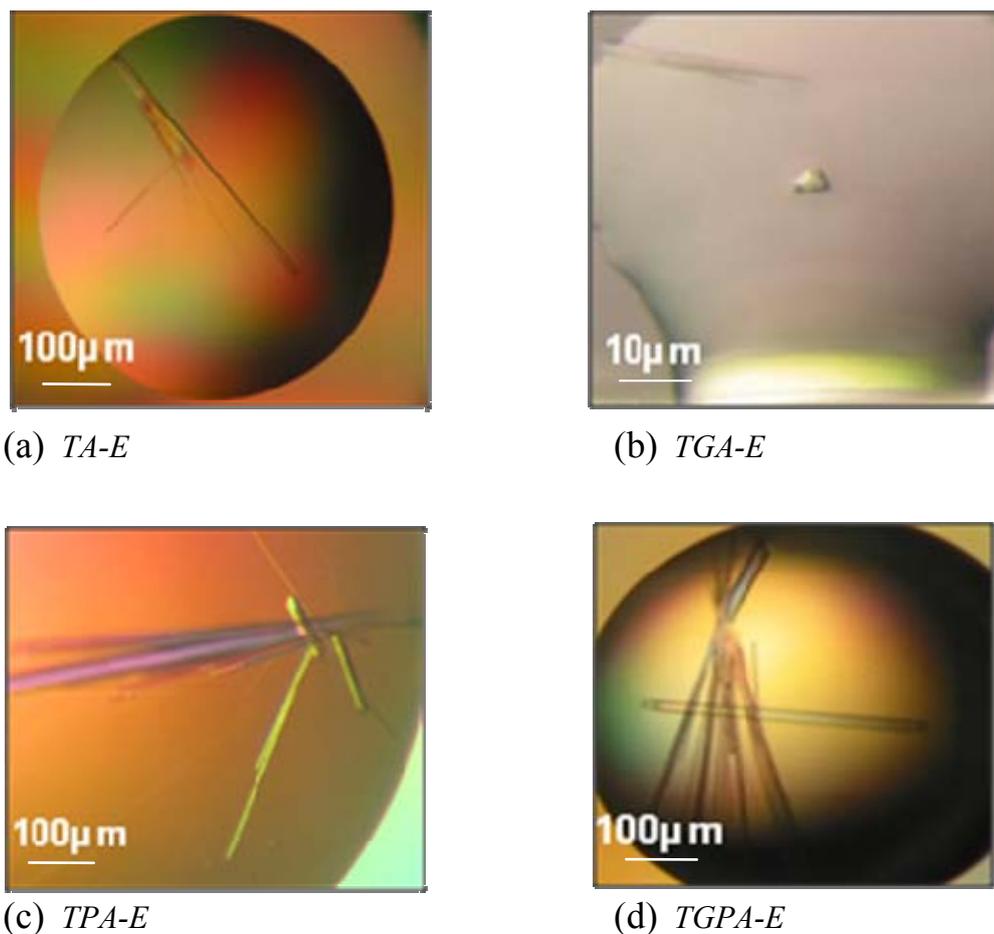


Abb. 25: Dreidimensionale Kristalle der vier untersuchten Proteinkomplexe: (a) *Triple-Ala* - Eglin C-L45K, ***TA-E***; (b) *Triple-Glu-Ala* - Eglin C-L45K, ***TGA-E***; (c) *Triple-Phe-Ala* - Eglin C-L45K, ***TPA-E***; (d) *Triple-Glu-Phe-Ala* - Eglin C-L45K, ***TGPA-E***. Der aus dem Kristallisations-screening in 96-er *well* Platten stammende Proteinkristall der Komplexvariante *Triple-Glu-Ala* - Eglin C-L45K (b) war um eine Größenordnung kleiner als die Proteinkristalle aus den 24-er *well* Platten.

4.2.3 Streuexperimente

Von jeweils einem Kristall der vier untersuchten Komplexe wurden Diffraktionsdaten gemessen (Tab. 6). Dazu wurden die Kristalle zuerst in Kryo-Puffer getränkt, mit Nylon-Loops auf einen Goniometerkopf platziert und im Stickstoffstrom auf 100 K schockgekühlt. Die Datenaufnahme erfolgte dann mittels der Rotationsmethode. Testdatensätze wurden zunächst von einem Kristall des jeweiligen Komplexes am hauseigenen Röntgengenerator gemessen. Im Anschluss wurden die gefrorenen Kristalle im Dewar-Gefäß in flüssigem Stickstoff für Messungen am Synchrotron aufbewahrt. Für Komplex *TGA-E* und *TGPA-E* erfolgte die eigentliche Datenaufnahme am BESSY II

Synchrotron in Berlin, für Komplex *TA-E* und *TPA-E* am DESY Synchrotron in Hamburg. Die Parameter der vier Datensammlungen sind in Tab. 6 zusammengefasst.

Tab. 6: Datensammlungsstatistik.

Datensammlung	Komplex <i>TA-E</i>	Komplex <i>TGA-E</i>	Komplex <i>TPA-E</i>	Komplex <i>TGPA-E</i>
Anzahl der Kristalle	1	1	1	1
Beamline (Quelle)	X12 (DESY, EMBL)	BL 14-1 (BESSY)	X12 (DESY, EMBL)	BL 14-1 (BESSY)
Detektor	MARCCD- 225	MARCCD- 225	MARCCD- 225	MARCCD- 225
Wellenlänge [Å]	1,0001	0,9184	1,0001	0,9184
Kristall-Detektor- Abstand [mm]	170	220	150	120
$\Delta\phi$ pro Image [°]	0,5	0,5	0,5	1
Gesamtrotation [°]	200	275	200	246
Belichtungszeit pro Image [sek]	15	5	15	1,2
Gesamtzahl der Images	400	550	400	246

Die aufgenommenen Diffraktionsdaten wurden mit den Programmen XDS (Kabsch, 1993) bzw. DENZO (Otwinowski & Minor, 1997) prozessiert (Tab. 7). Alle vermessenen Kristalle konnten in der Raumgruppe $P2_1$ mit den in Tab. 7 angegebenen Zelldimensionen indiziert werden. Mit dem Molekulargewicht von 31500 Da für einen Proteinkomplex und einem angenommenen Lösungsmittelgehalt von 47 % passen 2 komplette Trypsin-Variant - Eglin C-L45K Komplexe in die asymmetrische Einheit der monoklinen Elementarzelle (Matthews, 1968; Rupp & Kantardjieff, 2003).

Tab. 7: Datenprozessierungsstatistik. Die Werte in den Klammern bezeichnen die entsprechenden Werte für die jeweils höchste Auflösungsschale.

Prozessierung	Komplex <i>TA-E</i>	Komplex <i>TGA-E</i>	Komplex <i>TPA-E</i>	Komplex <i>TGPA-E</i>
Auflösungsbereich [Å]	50,0-1,81	20,0-2,10	50,0-1,51	30,0-1,35
Raumgruppe	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$	$P2_1$

Zellparameter [\AA , $^\circ$]	$a = 78,38$ $b = 36,90$ $c = 104,08$ $\beta = 103,25$	$a = 78,73$ $b = 35,08$ $c = 105,27$ $\beta = 104,26$	$a = 79,26$ $b = 37,03$ $c = 103,98$ $\beta = 102,24$	$a = 78,30$ $b = 36,92$ $c = 102,96$ $\beta = 103,41$
Gesamte/ Einzigartige Reflexe	218979/ 53347	186827/ 33178	309101/ 87657	377381/ 121538
Mosaizität [$^\circ$]	0,57	0,36	0,76	0,27
Redundanz	4,1	5,6	3,5	3,2
$I/\sigma(I)$	16,1 (1,9)	14,7 (4,1)	14,3 (2,0)	14,4 (2,3)
Vollständigkeit [%]	99,4 (97,2)	99,6 (99,8)	93,7 (65,9)	99,1 (98,1)
R_{merge} [%]	8,3 (72,0)	8,1 (49,7)	8,7 (55,7)	5,6 (59,9)
Gesamt-B-faktor aus Wilson-Plot [\AA^2]	24,3	30,3	17,6	18,1

Mit nominellen Auflösungsdaten von 1,81 \AA , 2,10 \AA , 1,51 \AA und 1,35 \AA für die von jeweils einem Kristall von Komplex *TA-E* bis *TGPA-E* aufgenommenen Röntgenstreuungen sind alle vier Datensätze von guter Qualität. Lediglich der Datensatz von Komplex *TGA-E* wies mit 2,1 \AA Auflösung eine etwas geringere Qualität als die anderen Datensätze auf. Anhand des Wertes für das Signal-zu-Rauschen-Verhältnis ($I/\sigma(I)$) in der höchsten Auflösungsschale stellt man fest, dass die Daten für den Komplex *TGA-E* sicher noch zu einer etwas höheren nominellen Auflösung hätten gemessen werden können. In Bezug auf die Statistiken, die sich aus der Mittelung von Mehrfachmessungen ergeben (zum Beispiel der *merging R-factor*, R_{merge}), sind alle vier Datensätze ungefähr gleichwertig. Auch die Vollständigkeit der Datensätze ist mit über 93% in allen vier Fällen gut, wobei der Datensatz des Komplexes *TPA-E* ein wenig abfiel. Der Grund für die etwas niedrige Vollständigkeit der Daten bei hoher Auflösung ist die relativ große Anzahl von überlappenden Reflexen, die auf ein zu großes ϕ -Inkrement bei der Datenaufnahme zurückzuführen ist. Der mit Abstand beste der vier untersuchten Datensätze bezüglich der nominellen Auflösung und dem *merging R-factor*, ist der Komplex *TGPA-E*.

4.2.4 Strukturlösung

Die Struktur des ersten Komplexes (*Triple-Glu-Ala* - Eglin C-L45K) wurde mittels der Methode des molekularen Ersatzes gelöst. Dazu wurden als Suchmodell *Triple-Glu* Trypsin (PDB-Eintrag: 1V2L, Rauh *et al.*, 2004) und natives Eglin C (PDB-Eintrag: 1ACB, Frigerio *et al.*, 1992) verwendet. Das Programm PHASER (McCoy *et al.*, 2007) fand insgesamt zwei Komplexe aus der Trypsin-Variante *Triple-Glu-Ala* und der Eglin C-

Mutante-L45K in der asymmetrischen Einheit der monoklinen Kristalle. Nach manueller Zuordnung der gefundenen Ketten zu ihren jeweiligen Komplexen wurden die Position und die Orientierung der Komplexe mittels *Rigid-Body-Refinement* optimiert. Da die Komplexe *TA-E*, *TPA-E* und *TGPA-E* isomorph zu dem Komplex *TGA-E* kristallisierten, konnten die Strukturverfeinerungen dieser Komplexe direkt mit der partiell verfeinerten Struktur vom Komplex *TGA-E* begonnen werden.

4.2.5 Strukturverfeinerung

Die Strukturen der vier Proteinkomplexe wurden mit dem Programm Refmac5 (Murshudov *et al.*, 1997; CCP4, 1994) verfeinert. Dabei wurde der Wichtungparameter (*weight*) so eingestellt, dass die mittlere quadratische Abweichung der verfeinerten Bindungslänge und Bindungswinkel von den Idealwerten (Engh & Huber, 1991) 0,02 Å und 2,0° nicht überstieg. Nach jeder Verfeinerungsrunde wurde das Modell mit Hilfe des Graphikprogramms COOT (Emsley & Cowtan, 2004) überprüft und gegebenenfalls manuell an die Elektronendichte angepasst. Der Fortgang der Verfeinerung wurde anhand des freien R-Faktors beobachtet. Nachdem der freie R-Faktor etwa 30% betrug, wurden TLS-Parameter (Winn *et al.*, 2001) mit in die Verfeinerung aufgenommen. Dabei wurde jeweils ein Komplex aus der Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K als ein fester Körper (*Rigid Body*) betrachtet. Die Ergebnisse der Strukturverfeinerung für die vier Komplexe sind in Tab. 8 dargestellt. In allen Fällen ergaben sich relativ niedrige R-faktoren, was die Qualität der Verfeinerung unterstreicht (Tab. 8).

Tab. 8: Verfeinerungsstatistik.

Verfeinerung	Komplex <i>TA-E</i>	Komplex <i>TGA-E</i>	Komplex <i>TPA-E</i>	Komplex <i>TGPA-E</i>
Auflösung [Å]	1,81	2,10	1,51	1,35
Gesamtzahl Reflexe für R-faktor	52245	31517	85868	119223
Gesamtzahl Reflexe für R _{free}	1095	1660	1760	6276
R-faktor [%]	18,54	20,93	17,33	18,75
R _{free} [%]	23,94	27,32	19,10	21,52
DPI [Å]	0,14	0,23	0,09	0,07
<i>rms</i> Abweichung:				
Bindungslänge [Å]	0,019	0,019	0,008	0,020
Bindungswinkel [°]	1,75	1,78	1,18	1,88

Gesamt-B-faktor:				
Trypsin-Variante	17,01	19,12	12,02	10,23
Eglin C-Mutante	16,14	17,52	10,92	9,55
Andere Atome	23,07	23,17	23,91	18,23
Proteinatome: ¹⁾				
Trypsin-Variante	3267	3267	3272	3305
Eglin C Mutante	1137	1090	1204	1171
Wasser-Sauerstoff- Atome	242	118	449	521
Sonstige Moleküle ^{2)/} Sonstige Atome	8 Gol, 4 Edo, 2 Ca ²⁺	3 Gol, 3 Edo, 2 Ca ²⁺	20 Gol, 8 Edo, 2 Ca ²⁺ , 1 Cl ⁻	9 Gol, 4 Edo, 2 Ca ²⁺ , 2 Cl ⁻
Erlaubte Reste im Ramachandranplot [%]	100	99,8	100	100

¹⁾ Die unterschiedlichen Atomzahlen resultieren aus unterschiedlich häufig auftretenden alternativen Konformationen in den Strukturen und aus der Gesamtzahl der in der Elektronendichte gut definierten Aminosäuren.

²⁾ Die Moleküle sind wie folgt abgekürzt: Gol = Glycerin; Edo = Ethylenglykol.

Anhand der kristallographischen Qualitätsfaktoren, *R_{free}*, Gesamt-B-faktor und Ramachandran-Plot (Tab. 8) ist zu erkennen, dass alle vier Komplexe zu guten R-Werten und freien R-Werten verfeinert werden konnten. Lediglich die Struktur vom Komplex *TGA-E* fiel mit einem *R_{free}* von 27.3% leicht gegen die anderen drei Strukturen ab. Mit hoher Wahrscheinlichkeit ist dies auf die geringere nominelle Auflösung der Röntgenstreudaten zurückzuführen. Das geht mit einem schlechteren Verhältnis von beobachteten Daten zu verfeinerten Parametern, die der Struktur zugrunde liegen, einher.

4.2.6 Beschreibung der Gesamtstrukturen

Wie bereits erwähnt, wurden bei der Lösung der Strukturen zwei Proteinkomplexe in der asymmetrischen Einheit gefunden. Diese werden im Folgenden als AB und CD bezeichnet, wobei A und C sich auf den jeweiligen Trypsin-Varianten-Teil und B und D sich auf den jeweiligen Teil der Eglin C-Mutante-L45K beziehen. Beide Komplexe wiesen unterschiedliche Umgebungen im Kristallgitter auf. Dies wird für die weitere Diskussion der Unterschiede zwischen den vier untersuchten Komplexen noch eine wichtige Rolle spielen.

Der Komplex *Triple-Ala* - Eglin C-L45K

Die Struktur vom Komplex *TA-E* besteht aus den Aminosäuren Ile16 bis Asp245 von *Triple-Ala* Trypsin und Glu2 bis Gly70 der Eglin C-Mutante-L45K im ersten Komplex in der asymmetrischen Einheit und den Aminosäuren Ile16 bis Asp245 bzw. Gly4 bis Gly70 im zweiten. Dazu kommen 242 Wassermoleküle, 8 Glycerine, 4 Ethylendiole und 2 Kalziumionen. Alle Aminosäuren weisen Hauptkettenrotationswinkel im erlaubten Bereich des Ramachandranplots auf. Alle Bereiche der Struktur sind in der Elektronendichte gut definiert. Der *rmsd*-Wert zwischen den beiden Komplexen in der asymmetrischen Einheit beträgt 0,46 Å.

Der Komplex *Triple-Glu-Ala* - Eglin C-L45K

Die Struktur von Komplex *TGA-E* besteht aus den Aminosäuren Ile16 bis Asp245 von *Triple-Glu-Ala* Trypsin und Ser5 bis Gly70 von Eglin C-L45K im ersten und zweiten Komplex in der asymmetrischen Einheit. Des Weiteren sind 118 Wassermoleküle, 3 Glycerine, 2 Ethylendiole und 2 Kalziumionen enthalten. 99,8% aller Aminosäuren weisen Hauptkettenrotationswinkel im erlaubten Bereich des Ramachandranplots auf. Ausnahme ist lediglich Ser172 in der Kette C der Trypsin-Variante. Alle Bereiche der Struktur sind in der Elektronendichte gut definiert. Der *rmsd*-Wert zwischen den beiden Komplexen der asymmetrischen Einheit beträgt 0,51 Å.

Der Komplex *Triple-Phe-Ala* - Eglin C-L45K

Die Struktur von Komplex *TPA-E* setzt sich aus den Aminosäuren Ile16 bis Asp245 von *Triple-Phe-Ala* Trypsin und Gly0 bis Gly70 von Eglin C-L45K im ersten und zweiten Komplex in der asymmetrischen Einheit zusammen. Dazu kommen 449 Wassermoleküle, 20 Glycerine, 8 Ethylendiole und 2 Kalziumionen und 1 Chloridion. Alle Aminosäuren weisen Hauptkettenrotationswinkel im erlaubten Bereich des Ramachandranplots auf. Fast alle Bereiche der Struktur sind in der Elektronendichte gut definiert. Lediglich die 175er-Schleife, gebildet aus den Aminosäuren Ser172 bis Ile175 in der C-Kette der Trypsin-Variante weist schlechte Elektronendichte auf, was auf eine erhöhte Flexibilität dieses Bereichs hinweist. Aufgrunddessen war es nicht möglich, die 175er-Schleife in der C-Kette zu bauen. In der A-Kette der Trypsin-Variante hingegen ist die 175er-Schleife definiert und nimmt eine andere Konformation ein als in der C-Kette. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den identischen Konformationen der 175er-Schleifen in den A- und C-Ketten der restlichen Trypsin-Varianten in den anderen drei gelösten

Proteinkomplexen. Unter Auslassung der 175er-Schleife beträgt der *rmsd*-Wert zwischen den beiden Komplexen in der asymmetrischen Einheit 0,50 Å.

Der Komplex *Triple-Glu-Phe-Ala* - Eglin C-L45K

Die *TGPA-E* Struktur besteht aus den Aminosäuren Ile16 bis Asp245 von *Triple-Glu-Phe-Ala* Trypsin und Gly0 bis Gly70 von Eglin C-Mutante-L45K im ersten Komplex in der asymmetrischen Einheit und den Aminosäuren Ile16 bis Asp245 bzw. Gly0 bis Gly70 im zweiten Komplex. Dazu kommen 521 Wassermoleküle, 9 Glycerine, 4 Ethylendiole und 2 Kalziumionen und 2 Chloridionen. Alle Aminosäuren weisen Hauptkettenrotationswinkel im erlaubten Bereich des Ramachandranplots auf. Alle Bereiche der Struktur sind in der Elektronendichte gut definiert. Der *rmsd*-Wert zwischen den beiden Komplexen in der asymmetrischen Einheit beträgt 0,45 Å.

4.2.7 Struktur und Strukturvergleiche

Da in jeder der vier Kristallstrukturen zwei vollständige Proteinkomplexe aus einer Trypsin-Variante und einer Eglin C-Mutante-L45K vorlagen, stehen für Strukturvergleiche insgesamt acht Komplexe zur Verfügung. In allen vier Strukturen sind abgesehen von Kristallkontakt-verursachten Unterschieden beide Komplexe in mehr oder weniger identisch. Eine Überlagerung der beiden Komplexe in der asymmetrischen Einheit ergab *rmsd*-Werte von 0,45-0,51 Å für insgesamt 564 überlagerte C α -Atompaaare in allen vier untersuchten Komplexen. Da die mittleren Koordinatenfehler in den Komplexen etwa 0,1-0,2 Å betragen (siehe Tab. 8), sind diese Werte im Rahmen des erwarteten.

Tab. 9: Vergleich der *rmsd*-Werte zwischen Trypsin-Varianten (Kette A vs. C), Eglin C-Mutanten-L45K (Kette B vs. D) und den beiden Komplexen (AB vs. CD) in der asymmetrischen Einheit.

Komplex	<i>rmsd</i> [Å] A vs. C	<i>rmsd</i> [Å] B vs. D	<i>rmsd</i> [Å] AB vs. CD
<i>TA-E</i>	0,50	0,19	0,46
<i>TGA-E</i>	0,52	0,27	0,51
<i>TPA-E</i>	0,56	0,19	0,50
<i>TGPA-E</i>	0,49	0,24	0,45

Aus Tab. 9 ist auch zu ersehen, dass der Großteil der beobachteten Abweichungen durch die strukturellen Variationen in den Trypsin-Varianten der Komplexe hervorgerufen

wurde. Der Beitrag der 64 überlagerten $\text{C}\alpha$ -Atompaare der Eglin C-Mutante-L45K scheint dabei offensichtlich eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Vergleicht man die Komplexe aus einer Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K der vier untersuchten Varianten miteinander, ergibt sich ein sehr ähnliches Bild. Die *rmsd*-Werte zwischen den Trypsin-Variant - Eglin C-L45K-Komplexen (Tab. 10) zeigen deutlich, dass es kaum strukturelle Unterschiede zwischen den vier Komplexen gab. Strukturell am Ähnlichsten waren sich die Komplexe *TPA-E* und *TGPA-E*. Für deren Überlagerung von 282 $\text{C}\alpha$ -Atompaaren konnte ein *rmsd*-Wert von 0,20 Å ermittelt werden. Mit einem *rmsd*-Wert von 0,58 Å variierten die Komplexe *TGA-E* und *TGPA-E* strukturell am stärksten voneinander. Wie in Tab. 9 sind sich auch hier die Trypsin-Varianten der Komplexe ähnlicher als die Egline. Unterschiede in der Eglin C-Mutante-L45K sind daher nahezu vernachlässigbar.

Tab. 10: Vergleich der *rmsd*-Werte der Trypsin-Varianten (Kette C), Eglin C-Mutanten-L45K(Kette D) und der Komplexstrukturen (Ketten CD) untereinander. Jeweils der erste Komplex in der Liste wurde als Zielkomplex festgelegt und der zweite darauf überlagert.

Komplex	<i>rmsd</i> [Å] C vs. C	<i>rmsd</i> [Å] D vs. D	<i>rmsd</i> [Å] CD vs. CD
<i>TA-E</i> vs. <i>TGA-E</i>	0,28	0,22	0,39
<i>TA-E</i> vs. <i>TPA-E</i>	0,24	0,11	0,25
<i>TA-E</i> vs. <i>TGPA-E</i>	0,48	0,14	0,44
<i>TGA-E</i> vs. <i>TPA-E</i>	0,34	0,23	0,47
<i>TGA-E</i> vs. <i>TGPA-E</i>	0,51	0,26	0,58
<i>TPA-E</i> vs. <i>TGPA-E</i>	0,17	0,16	0,20

Die Kristallstrukturen der Proteinkomplexe sind in Abb. 26 gezeigt. Wie bereits bekannt war (Huber *et al.*, 1974; Stroud *et al.*, 1974), besteht die Sekundärstruktur der Trypsin-Varianten aus zwei 6-strängigen β -Faltblättern. Die Eglin C-Mutante-L45K besitzt einen hydrophoben Kern, gebildet aus einem verdrehten 4-strängigen β -Faltblatt und einer kurzen α -Helix (McPhalen *et al.*, 1985). Mit seiner exponierten Bindungsschleife interagiert der Inhibitor mit der Protease als Substratanalogon. Stabilisiert wird diese Interaktion lediglich durch nicht-kovalente Wechselwirkungen. Wie die Überlagerung der vier gelösten Komplexstrukturen zeigt, treten strukturelle Unterschiede hauptsächlich im Bereich der 175er-Schleife der Trypsin-Varianten auf. Konformationelle Unterschiede im trypsin-spezifischen Eglin C sind aufgrund der Entfernung zur Protease-Inhibitor Interaktionsfläche für die weiteren Betrachtungen vernachlässigbar.

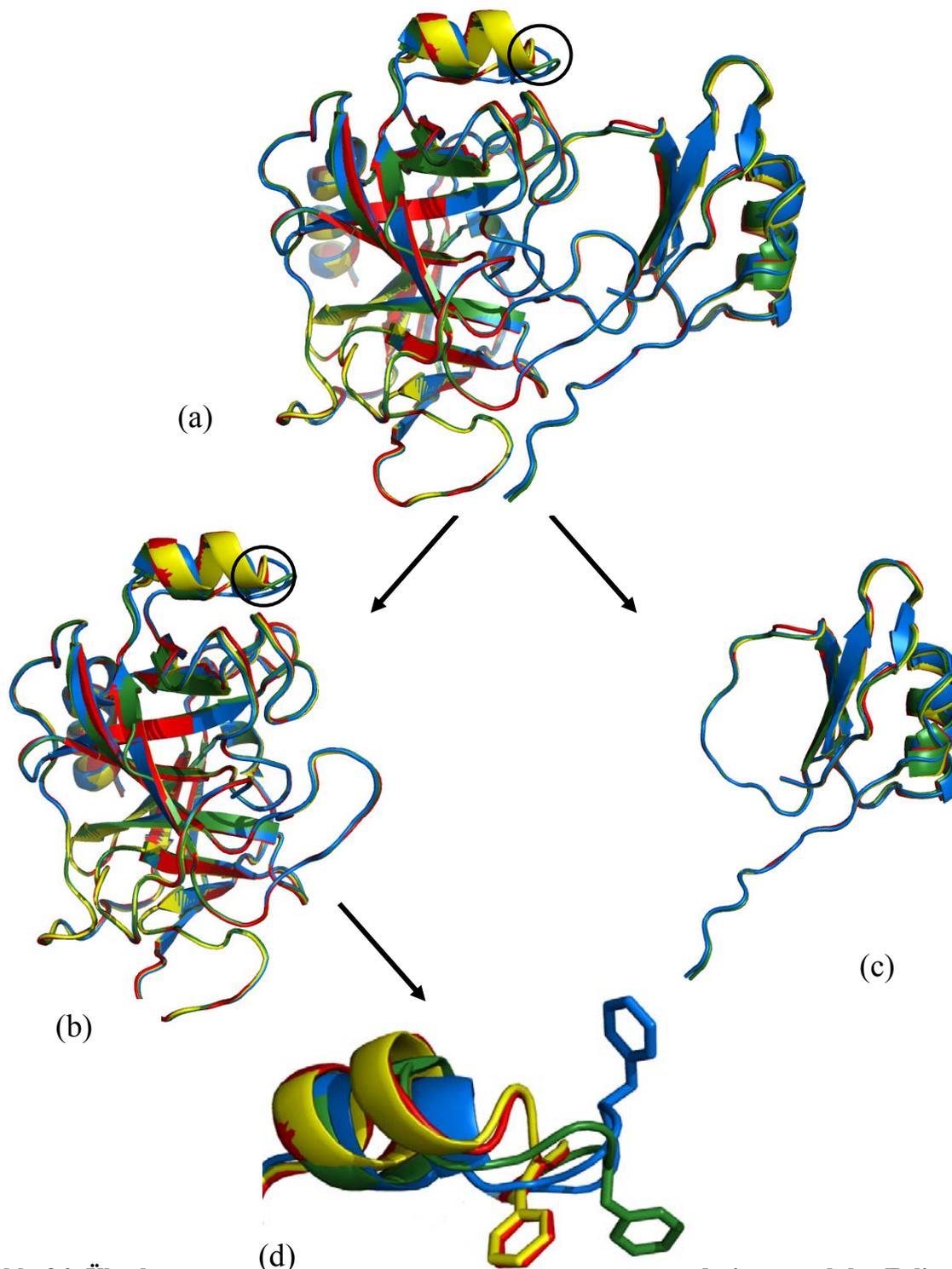


Abb. 26: Überlagerung der Kristallstrukturen aus einer Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K. Komplex *TA-E* ist in gelb dargestellt, Komplex *TGA-E* in rot, Komplex *TPA-E* in blau und Komplex *TGPA-E* in grün. Die 175er-Schleife der Trypsin-Varianten ist als schwarzer Kreis hervorgehoben. (a) Überlagerung der Gesamtstrukturen. (b) Darstellung der Trypsin-Varianten allein. (c) Darstellung der Eglin C-Mutanten allein. (d) *Close-up-view* der Konformation der 175er-Schleifen in den Trypsin-Varianten. Phe174 ist als *stick-Modell* veranschaulicht. Für die Abbildungen wurden jeweils die Konformationen der Komplexe CD in den untersuchten Strukturen verwendet. Eine Ausnahme stellt Komplex *TPA-E* dar. Aufgrund der nicht definierten Elektronendichte der 175er-Schleife in der C-Kette, wurde die A-Kette dargestellt.

4.2.8 Beschreibung der Kontaktfläche zwischen den Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante-L45K in den untersuchten Komplexen

Die Kontaktflächen zwischen den Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante-L45K in den einzelnen Komplexen wurden mit Hilfe des PISA-Servers (Krissinel & Henrick, 2007) untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengefasst. In allen vier Fällen beträgt die Wechselwirkungsfläche zwischen Trypsin und Eglin C etwa 900 \AA^2 . Außerdem sind immer knapp 40 Aminosäuren auf der Trypsinseite und 20 Aminosäuren auf der Eglin C-Seite in die Kontaktfläche involviert (Abb. 27). Auf der Eglin C-Seite besteht die Interaktion im Wesentlichen aus drei Kontaktbereichen. Der N-terminale Bereich des trypsin-spezifischen Eglin Cs (Aminosäuren Thr1 bis Leu7) interagiert mit dem Bereich 149-153 auf der Trypsinseite. Dabei bildet die Aminosäure Ser5 von Eglin C-L45K eine doppelte Hauptketten-Hauptketten-Wasserstoffbrücke mit Tyr151 auf der Trypsinseite aus. Der zentrale Kontaktbereich zwischen den beiden Bindungspartnern wird auf der Eglin C-Seite von der inhibitorischen Schleife (Aminosäuren Gly40-Arg53) gebildet. Diese Schleife bildet mit Abstand die meisten Wechselwirkungen zum Trypsin aus, wobei auf der Trypsinseite die folgenden Bereiche involviert sind: Aminosäuren Tyr39 bis Phe41, Aminosäure Tyr99, Aminosäuren Ala190 bis Ala195 und Ser214 bis Ser217. Die für die Inhibition wichtigste Wechselwirkung ist ausgehend von Lys45 des Eglin Cs. Lys45 bildet sowohl Hauptketten-Hauptketten-Wasserstoffbrückenbindungen mit Gly93, Ala195 (dem in der aktiven Variante der katalytische Rest Ser195 entspricht) und Ser214 aus, wie auch eine Seitenketten-Seitenketten-Salzbrücke mit der Carboxylatgruppe von Asp189, das sich am Boden der S1-Bindetasche befindet. Dabei bindet die Seitenkette von Lys45 in einer gestreckten Konformation (Abb. 27) in die S1-Bindetasche. Weitere, allerdings weniger spezifische Kontakte werden von den drei C-terminalen Aminosäuren (His68 - Gly70) der Eglin C-Mutante-L45K ausgebildet.

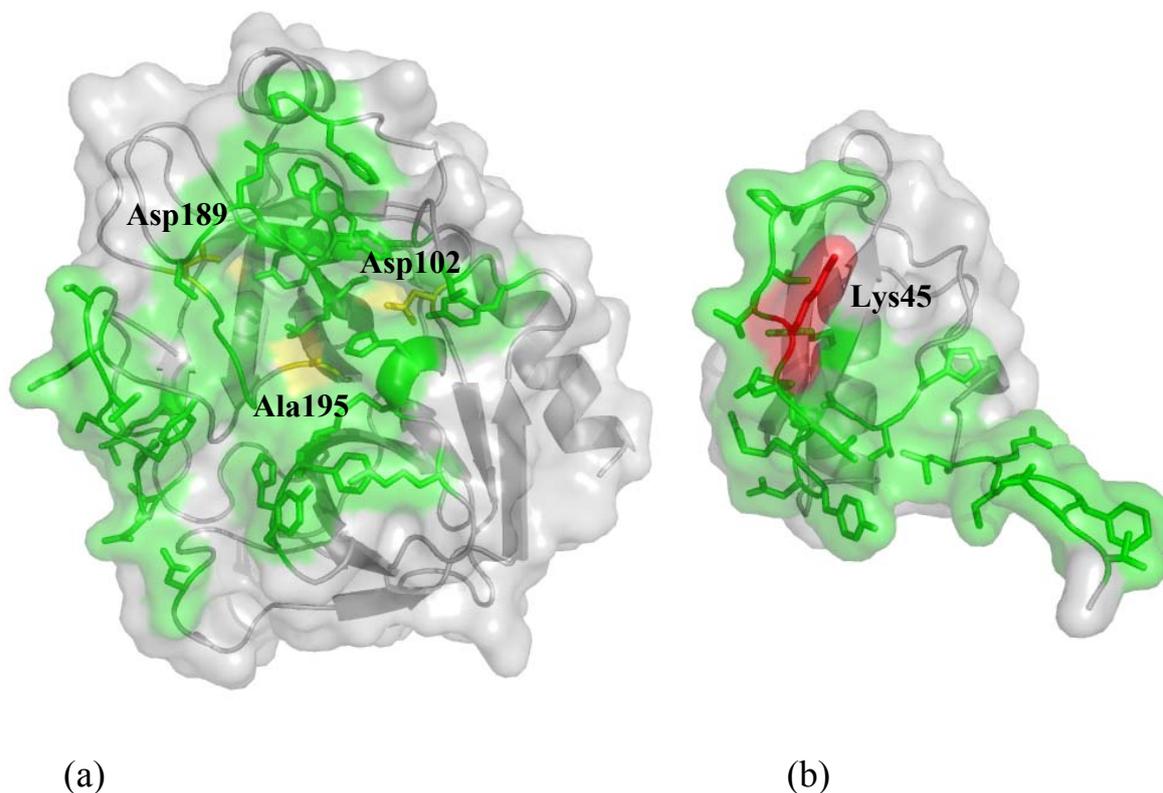


Abb. 27: Oberflächendarstellung einer Trypsin-Variante (a) und trypsin-spezifischem Eglin C (b). Grün markiert sind die interagierenden Aminosäurereste einer Trypsin-Variante (Thr21, Tyr39, His40, Phe41, Cys42, His57, Cys58, Lys60, Asn74, Tyr94, Ser96, Tyr99, Asp102, Lys145, Ser147, Gly148, Thr149, Ser150, Tyr151, Pro152, Asp153, Val154, Lys156, Ser174, Phe174, Asp189, Ala190, Cys191, Gln192, Gly193, Ala195, Val213, Ser214, Trp215, Gly216, Glu217, Gly219, Cys220, Gly226, Phe227, Tyr228) und der Eglin C Mutante L45K (Thr1, Glu2, Phe3, Gly4, Ser5, Glu6, Leu7, Gly40, Ser41, Pro42, Val43, Thr44, Lys45, Asp46, Leu47, Arg48, Tyr4, Asn50, Arg51, Arg53, His68, Val69, Gly70). Asp102, Asp189 und Ala195 in der Trypsin-Variante sind gelb hervorgehoben. In der Eglin C-Mutante-L45K ist Lys45 rot hervorgehoben. Zur Veranschaulichung ist der Komplex aus einer Trypsin-Variante und Eglin C-L45K aufgeklappt. Die Orientierung der Eglin C-Mutante ist im Vergleich zu der im Komplex um etwa 180° um eine vertikale Achse gedreht.

Von den in Abb. 27 aufgeführten Aminosäureresten sind zum einen 14 Reste auf der Trypsinseite und 10 Reste auf der Eglin C-Seite an der Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und zum anderen 3 Reste von jeder Komponente des Komplexes an der Formation von Salzbrücken zur Stabilisierung der Komplexbildung beteiligt (siehe Anhang Tab. A2 & A3). Es ist auffällig, dass im Komplex *TGA-E* die Wasserstoffbrückenbindung 3, als auch die Salzbrücken 3 und 4, länger sind als in den restlichen, untersuchten Proteinkomplexen.

4.2.9 Detaillierte Beschreibung der Konformation der 175er-Schleife in den vier untersuchten Proteinkomplexen

4.2.9.1 Die 175er-Schleife im Komplex *TA-E*

In dem *TA-E* Proteinkomplex, gebildet aus der *Triple-Ala* Trypsin-Variante und der Eglin C-Mutante-L45K, ist die intermediäre Helix mit der 175er-Schleife in der gleichen Orientierung, wie es für die entsprechende katalytisch aktive *Triple* Variante im Komplex mit niedermolekularen Liganden beobachtet worden ist. Die Schleife befindet sich in der sogenannten *down*-Konformation, die mit dem charakteristisch verborgenem Phe174 und einer verbreiterten, teilweise aufgewundenen intermediären Helix (Abb. 28) einhergeht.

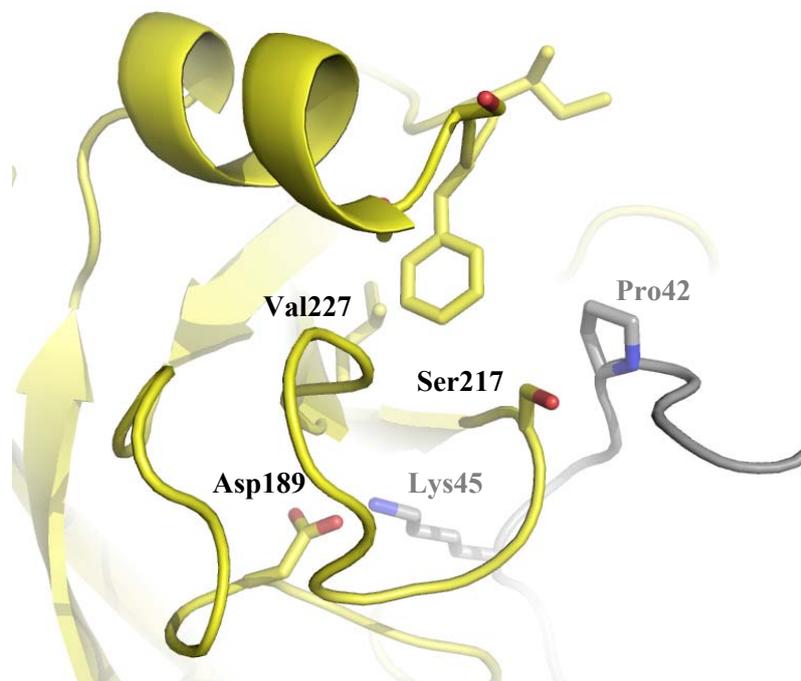


Abb. 28: Down-Konformation der 175er-Schleife im Komplex *TA-E*. Die *Triple-Ala* Variante ist gelb dargestellt, die Eglin C-Mutante-L45K grau. Die Reste der 175er-Schleife, Ser217, Asp189, Val227 der Variante und Pro42, Lys45 des Eglin Cs sind als *sticks* hervorgehoben.

4.2.9.2 Die 175er-Schleife im Komplex *TGA-E*

Im Komplex *TGA-E* ist das Ser217, das in bovinem Trypsin an dieser Position zu finden ist, gegen Glutaminsäure ausgetauscht. Die daraus resultierende *Triple-Glu-Ala* Variante bildet mit der Eglin C-Mutante-L45K den zweiten, untersuchten Komplex. Während die katalytisch aktive *Triple-Glu* Variante verschiedene, Konformationen in Bezug auf die 175er-Schleife der intermediären Helix, in Abhängigkeit vom niedermolekularen Inhibitor, einnehmen konnte (Rauh *et al.*, 2004), wird in dem vorliegenden Komplex nur

eine Orientierung angenommen. Durch Bindung der Eglin C-Mutante-L45K wird die 175er-Schleife in der *down*-Konformation fixiert, Phe174 ins hydrophobe Innere des Proteins gedrückt und die intermediäre Helix teilweise aufgewunden (Abb. 29). Durch die Ser217Glu-Mutation und der dadurch fehlenden Wasserstoffbrückenbindung, zwischen Ser217-OG und Gly40-O (siehe Anhang Tab. A2), ist die Hauptkette der Eglin C-Mutante-L45K im Vergleich zur der in den anderen untersuchten Komplexen um 1,2 -1,4 Å verschoben (Abb. 30).

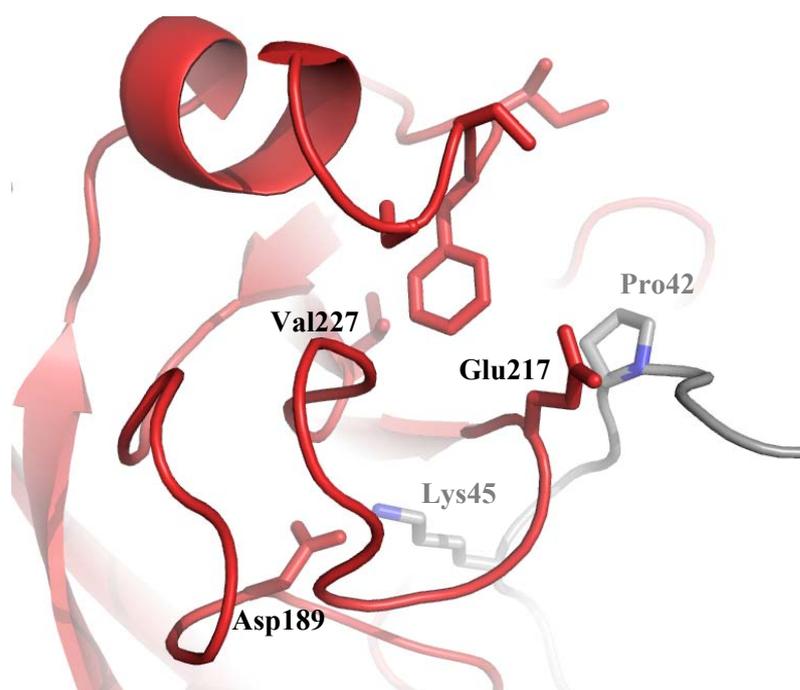


Abb. 29: Down-Konformation der 175er-Schleife in Komplex TGA-E. Die Triple-Glu-Ala Variante ist rot dargestellt, die Eglin C-Mutante-L45K grau. Die Reste der 175er-Schleife, Glu217, Asp189, Val227 der Variante und Pro42, Lys45 des Eglin Cs sind als *sticks* hervorgehoben.

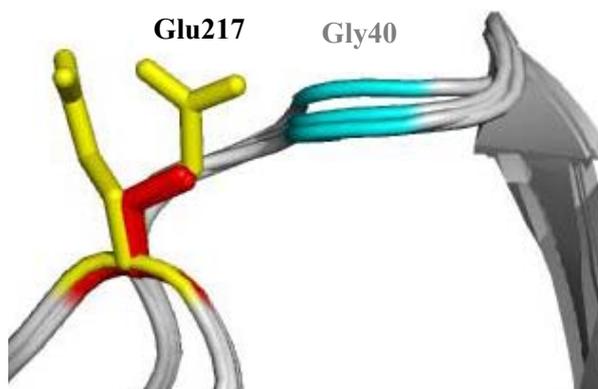


Abb. 30: Einfluß der Glu217-Gly40-Interaktion. Es ist ein Ausschnitt der Überlagerung aller vier bearbeiteten Komplexe dargestellt. Rest 217 auf der Trypsinseite und Gly40 auf der Eglin C-Seite sind als *sticks* hervorgehoben. Im Komplex TGA-E wird die Hauptkette der Eglin C-Mutante-L45K durch das Glu217 um 1,2-1,4 Å verschoben.

4.2.9.3 Die 175er-Schleife im Komplex *TPA-E*

Die Trypsin-Variante *Triple-Phe-Ala* und die Eglin C-Mutante-L45K bilden den untersuchten Proteinkomplex *TPA-E*. Im *Triple-Phe-Ala* Trypsin ist Val227, das in der Primärstruktur des bovinen Trypsins an dieser Stelle vorkommt, gegen ein sperriges, hydrophobes Phenylalanin ausgetauscht worden. Wie bereits angesprochen, wurden bei der Lösung der Strukturen zwei Proteinkomplexe in der asymmetrischen Einheit gefunden, AB und CD. Beide Komplexe weisen unterschiedliche Umgebungen im Kristallgitter auf. Während die 175er-Schleife im Komplex AB in der Nähe eines symmetrieverwandten Molekülen liegt (Abb. 31a), befindet sich die Schleife im Komplex CD weit entfernt von Kristallkontakten (Abb. 31b). Demgemäß könnte es sich bei der in Komplex CD beobachteten Konformation der 175er-Schleife um eine physiologisch relevantere handeln, da sie im Gegensatz zu der in Komplex AB nicht durch Kristallkontakt beeinflusst worden ist. Allerdings sind in drei von vier Kristallstrukturen die Orientierungen der 175er-Schleifen in den AB und CD-Komplexen identisch. Eine Ausnahme stellt der Komplex *TPA-E* dar.

Im Komplex CD des *TPA-E* Komplexes ist die 175er-Schleife ungeordnet (siehe Abb. 31b), während im Komplex AB derselben Struktur Phe174 der 175er-Schleife eine bisher nicht beobachtete Orientierung einnimmt (Abb. 31a). Diese Konformation wird durch die Ausbildung von Kristallkontakten zwischen den Aminosäuren 169-175 in der A-Kette mit den Resten Ser244, Ala243 und Ile242 (x,y+B,z) stabilisiert, vielleicht sogar erst ermöglicht. Das Fehlen definierter Elektronendichte für die 175er-Schleife (Ser172-Ile175) im CD-Komplex ist ein Indiz für die hohe Flexibilität dieses Bereiches, die mit einer Destabilisierung der 175er-Schleife einhergeht. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den strukturellen Daten der aktiven *Triple-Phe* Variante im Komplex mit niedermolekularen Inhibitoren (Tziridis, 2008). Auch die Interaktion mit der Eglin C-Mutante-L45K bei Bindung kann die Schleife nicht stabilisieren.

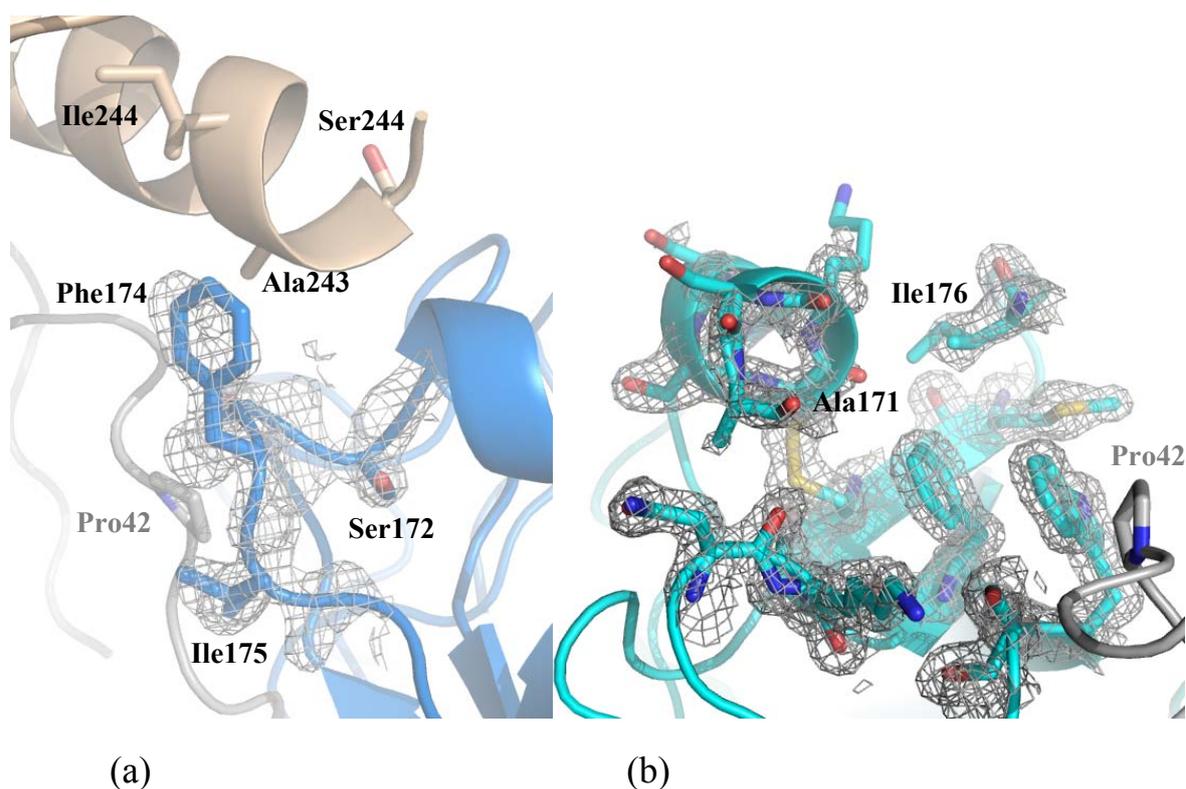


Abb. 31: Ausschnitt der Ketten AB (a) und CD (b) im Komplex *TPA-E*. Die Trypsin-Variante *Triple-Phe-Ala* in Komplex AB ist in blau dargestellt, in dem entsprechenden Komplex CD in cyan. Das interagierende Eglin C-L45K mit Pro42 ist jeweils grau hervorgehoben. (a) Die ungewöhnliche Konformation des Phe174 wird durch Kristallkontakte mit dem symmetrie-verwandten Molekül, in beige, stabilisiert. Dabei tritt die 175er-Schleife der A-Kette in Kontakt mit Ser244, Ala243 und Ile242 des symmetrieverwandten Moleküls ($x,y+B, z$). Die *2fofc*-Elektronendichte ($\sigma=1$) in Kette A ist daher um die 175er-Schleife gut definiert. (b) Alle Aminosäurereste, die bis zu 5 Å mit der flexiblen 175er-Schleife in Kontakt stehen, sind im *stick*-Modell mit *2fofc*-Elektronendichte ($\sigma=1,0$) hervorgehoben. Aufgrund fehlender Elektronendichte konnten die Reste Ser72-Ser173-Phe174-Ile175 der 175er-Schleife nicht zugeordnet werden. Die Orientierung ist im Vergleich zu (a) gedreht.

4.2.9.4 Die 175er-Schleife im Komplex *TGPA-E*

Der Proteinkomplex *TGPA-E* setzt sich aus der Trypsin-Variante *Triple-Glu-Phe-Ala* und der Eglin C-Mutante-L45K zusammen. Das Protein *Triple-Glu-Phe-Ala* vereint die Mutationen Ser217Glu und Val227Phe, was sich in einer Stabilisierung der intermediären Helix mit der angrenzenden 175er-Schleife auswirkt, die in dem vorliegenden Komplex eine sogenannte *up*-Konformation einnimmt (Abb. 32). In dieser Faktor Xa-ähnlichen Orientierung ist das Phe174 der lösungsmittelzugänglichen Oberfläche des Proteins zugewandt und die intermediäre Helix infolgedessen vollständig ausgebildet. Allerdings ist die Ausrichtung der Phe174-Seitenkette eine andere als in Faktor Xa, wie die

Überlagerung beider Strukturen in Abb. 32 b zeigt. Durch die Bindung der Eglin C-Mutante ist das Ringsystem des Phe174 in sterischem Konflikt mit dem Pro42 des Eglin Cs. Im Vergleich zu der Orientierung in Faktor Xa ändert sich der χ_1 -Winkel von Phe174 um etwa 80° und der χ_2 -Winkel um etwa 50° .

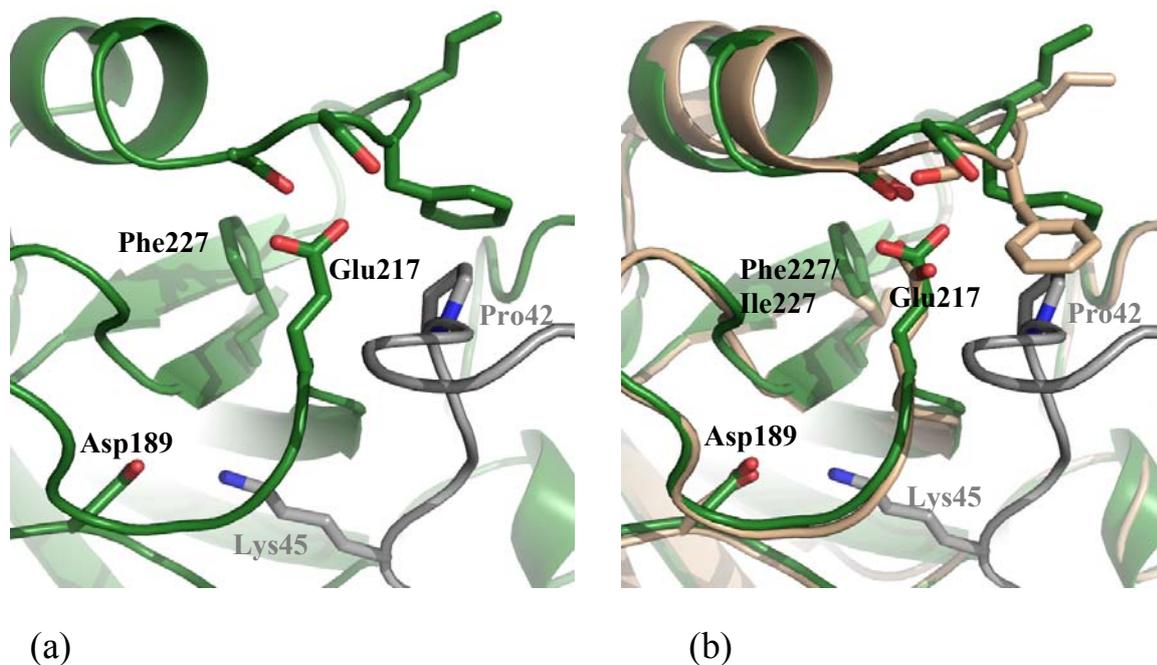


Abb. 32: *Up*-Konformation der 175er-Schleife im Komplex *TGPA-E* (a) und in der Überlagerung mit humanem Faktor Xa (b). Die *Triple-Glu-Phe-Ala* Variante ist grün dargestellt, die Eglin C-Mutante-L45K grau. Humaner Faktor Xa ist in beige abgebildet. Die Orientierung ist im Vergleich zu Abb. 29 & 30 leicht gedreht und liegt wie in Abb. 32 vor. (a) Die Reste der 175er-Schleife, Glu217, Asp189, Phe227 der Variante bzw. Ile227 des Faktors Xa und Pro42, Lys45 des Eglin Cs sind als *sticks* hervorgehoben. (b) Des Weiteren ist zum Vergleich der Orientierung der 175er-Schleife eine Überlagerung der *Triple-Glu-Phe-Ala* Variante mit humanem Faktor Xa gezeigt.

4.2.10 Einfluß der Eglin C-L45K-Bindung auf die Konformation der 99er-Schleife in den Trypsin-Varianten

Die Wechselwirkung der Eglin C-Mutante-L45K mit den Trypsin-Varianten beeinflusst nicht nur die Konformation der 175er-Schleifen, sondern auch die Orientierung der Tyrosinseitenkette in Position 99, welche Teil der 99er-Schleife in den Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten ist. Im Vergleich zu der beobachteten Konformation in Faktor Xa (Abb. 33) rotierte die Seitenkette von Tyr99 in allen untersuchten Proteinkomplexen durch Eglin C-L45K-Bindung um jeweils etwa 60° um die beiden

Seitenkettendihedralwinkel χ_1 und χ_2 . Ein möglicher Grund dafür ist ein sterischer Konflikt zwischen dem Thr44 der exponierten Proteasebindeschleife des Eglin C-L45Ks und dem Ringsystem des Tyr99 der Trypsin-Varianten. Die Verschiebung kann in allen vier Trypsin-Varianten beobachtet werden. Ein ähnlicher sterischer Einfluß auf die Konformation der Seitenkette des Tyr99, ausgelöst allerdings durch eine Disulfidbrücke, wurde im Kallikrein-BPTI-Komplex beobachtet (Chen & Bode, 1993).

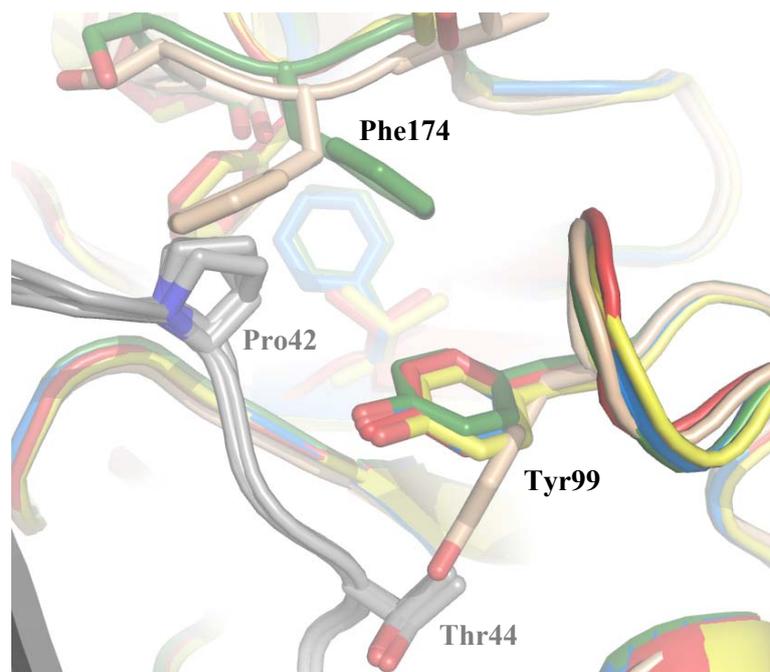


Abb. 33: Einfluß der Eglin C-L45K-Bindung auf die Konformation der 99er-Schleife in den Trypsin-Varianten. Es ist ein Ausschnitt aller vier untersuchten Komplexe in Überlagerung mit Faktor Xa, beige, dargestellt. Aufgrund eines sterischen Konfliktes zwischen Thr44 der Eglin C-L45K rotiert die Tyrosinseitenkette 99 der Trypsin-Varianten um jeweils etwa 60° um die χ_1 - und χ_2 -Winkel, im Vergleich zu der Konformation in Faktor Xa verschoben.

4.2.11 Berechnete Stabilität der vier untersuchten Komplexe

Analog zur Kontaktfläche wurde auch die Stabilität der einzelnen Komplexe mit Hilfe des PISA-Servers untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 11 zusammengefasst. In allen vier Fällen beträgt die Wechselwirkungsfläche zwischen den Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante-L45K etwa 900 \AA^2 . Ausserdem sind immer knapp 40 Aminosäuren auf der Trypsinseite und 20 Aminosäuren auf der Eglinseite in die Kontaktfläche involviert. Deutliche Unterschiede gibt es allerdings bei den freien Solvatationsenergiegewinnen. Hier erscheint Komplex *TPA-E* als der am wenigsten stabile. Die Komplexe *TA-E* und

TGPA-E weisen eine etwa identische Stabilität auf, wohingegen Komplex *TGA-E* der stabilste der vier untersuchten Komplexe zu sein scheint.

Tab. 11: Kontaktflächen und abgeschätzte Wechselwirkungsenergien für die vier untersuchten Komplexe.

Komplex	Kette	ⁱ N _{Reste}	Kette	ⁱ N _{Reste}	Interaktionsfläche, [Å] ²	Δ ⁱ G [kJ mol ⁻¹]
<i>TA-E</i>	A	37	B	22	913,2	-35,1
	C	37	D	20	866,1	-41,8
	Durchschnitt: 889,6					-38,5
<i>TGA-E</i>	A	34	B	19	857,3	-42,2
	C	35	D	19	866,1	-41,4
	Durchschnitt: 861,7					-41,8
<i>TPA-E</i>	A	40	B	23	969,9	-35,1
	C ¹⁾	39	D	24	950,0	-33,8
	Durchschnitt: 960,0					-34,7
<i>TGPA-E</i>	A	40	B	24	964,5	-39,2
	C	41	D	23	972,5	-37,2
	Durchschnitt: 968,5					-38,1

ⁱN bezeichnet die Anzahl der Aminosäuren, die an der Kontaktfläche beteiligt sind.

ΔⁱG bezeichnet den Gewinn an freier Solvatationsenergie bei der Ausbildung der jeweiligen Kontaktfläche.

¹⁾ Die in Kette C fehlenden 5 Aminosäuren (Ser172-Ile175) haben keinen Einfluß auf die Berechnungen, da die 175er-Schleife nicht an der Wechselwirkung mit dem Inhibitor beteiligt ist.

4.2.12 Modellkomplexe von nativem Trypsin und der katalytischen Domäne von Faktor Xa mit der Eglin C-Mutante-L45K

Um Kenntnisse zu gewinnen, wie stabil die jeweiligen Komplexe aus nativem Trypsin bzw. aus der katalytischen Domäne von Faktor Xa und der Eglin C-Mutante-L45K sein könnten, wurden Modellkomplexe generiert und deren Stabilitäten ebenfalls mittels PISA-Server berechnet. Zur Modellierung wurde die Struktur von nativem Trypsin (PDB-Eintrag: 1MTS (Stubbs *et al.*, 1995) auf die Kette A des Komplexes *TA-E* überlagert. Dann wurden die Koordinaten des rotierten Trypsins mit denen der Eglin C-Mutante-L45K aus dem Komplex *TA-E* kombiniert und diese als Modell für einen hypothetischen Komplex aus Trypsin und trypsin-spezifischem Eglin C definiert. Analog dazu erfolgte die Generierung des hypothetischen Faktor Xa-Eglin C-L45K Komplexes. Die

Koordinaten für die katalytische Domäne von Faktor Xa wurden dem PDB-Eintrag: 1FJS (Adler *et al.*, 2000) entnommen und auf die A-Kette des Komplexes *TGPA-E* überlagert. Wie in Tab. 12 zusammengefasst, ist der Gewinn an freier Solvatationsenergie bei der Ausbildung des Komplexes aus Faktor Xa und der Eglin C-Mutante deutlich geringer als für natives Trypsin und die jeweiligen Varianten des Trypsins (siehe Tab. 11). Diese Berechnungen, die auf eine geringe Stabilität des Faktor Xa-Eglin C-Komplexes hinweisen, stehen im Einklang mit der beobachteten reduzierten Affinität in den ITC-Experimenten (siehe Kapitel 4.4.2) und dem Faktor Xa-Inhibitionsassay (siehe Kapitel 4.5).

Tab. 12: Kontaktflächen und abgeschätzte Wechselwirkungsenergien für die Modellkomplexe von nativem Trypsin und der katalytischen Domäne von Faktor Xa mit der Eglin C-Mutante-L45K.

Komplex	Kette	ⁱ N _{Reste}	Kette	ⁱ N _{Reste}	Interaktionsfläche, [Å] ²	Δ ⁱ G [kJ mol ⁻¹]
Faktor Xa-E ¹⁾	A	41	B	26	1141,3	-9,2
Trypsin-E	A	35	B	21	872,3	-30,9

¹⁾ Bei der Überlagerung der Koordinaten der katalytischen Domäne von Faktor Xa auf *TGPA-E* wurden Tyr99 und Phe174 des Faktor Xas an die Koordinaten von *TGPA-E* angepaßt, um sterische Konflikte zu verhindern.

4.3 Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (NMR)

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten NMR-spektroskopischen Experimente stellen eine Weiterführung der bereits im Vorfeld durchgeführten Studien (Menzel, 2004) dar. In Menzel (2004) wurden ¹⁵N-markierten Proteinproben von zwei katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten, *Triple-Ala* und *Triple-Glu-Ala*, mit einem nicht-markierten Faktor Xa-Inhibitor titriert. Dabei wurden mehrere HSQC-Spektren aufgenommen. Der verwendete Ligand war ein potenter Faktor Xa-Inhibitor, die sogenannte Zeneca-Verbindung, mit deren Hilfe in der Kristallstruktur der katalytisch aktiven *Triple-Glu* Trypsin-Variante der Übergang von der *super-up* zur *up*-Konformation induziert worden war.

Eine Analyse der Spektren ergab Signalverschiebungen beim Übergang von der trypsin-ähnlichen *Triple-Ala* Variante zur Faktor Xa-ähnlicheren *Triple-Glu-Ala* Variante, was auf eine große Änderung im dynamischen Verhalten der Varianten schließen ließ. Aussagen darüber welche Aminosäuren bei den Titrationsexperimenten eine Änderung in

ihrer räumlichen Anordnung erfuhren, konnten auf Basis der 2D-Heteroexperimente nicht getroffen werden, da eine Zuordnung der Kreuzsignale zu den entsprechenden Aminosäuren aufgrund zahlreicher Resonanzüberlappungen nicht möglich war.

Um dieses Problem anzugehen, wurden im Rahmen der Dissertation dreidimensionale NMR-spektroskopische Analysen an doppelt-markierten, katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten durchgeführt. Durch Entzerrung der Spektren in eine dritte Dimension sollte die Überlappung von Signalen in den zweidimensionalen Spektren aufgehoben werden.

Ein solches 3D-Experiment ist z.B. die Kombination NOESY-HSQC. Es basiert auf der Kopplung der Pulssequenzen für ein 2D-NOESY und ein 2D-HSQC. Dabei wird die Distanz zwischen zwei Protonen gemessen, wobei einer der beiden Partner durch die Korrelation mit einem Heterokern (z.B. ^{15}N) identifiziert beziehungsweise aufgelöst wird. Das ^{15}N -NOESY-HSQC ist dann die Basis für die sequenzspezifische Zuordnung der NMR-Signale. Die entsprechenden ^{13}C -Varianten der Spektren sind wichtig für die Zuordnung der Seitenketten und für die Identifikation von NOE-Signalen zwischen den Proteinen und Seitenketten. Die entsprechenden Spektren zeigen eine deutlich bessere Auflösung und eine geringere spektrale Überlappung.

Um ein 3D-Spektrum aufnehmen zu können, muss pro indirekte Dimension eine große Zahl von Einzel-Experimenten durchgeführt werden, wobei meist nicht das ganze Spektrum, sondern nur ein Teilbereich angeregt wird. Aufgrund dessen sind die Messungen langwierig und dauern mehrere Tage bis Wochen.

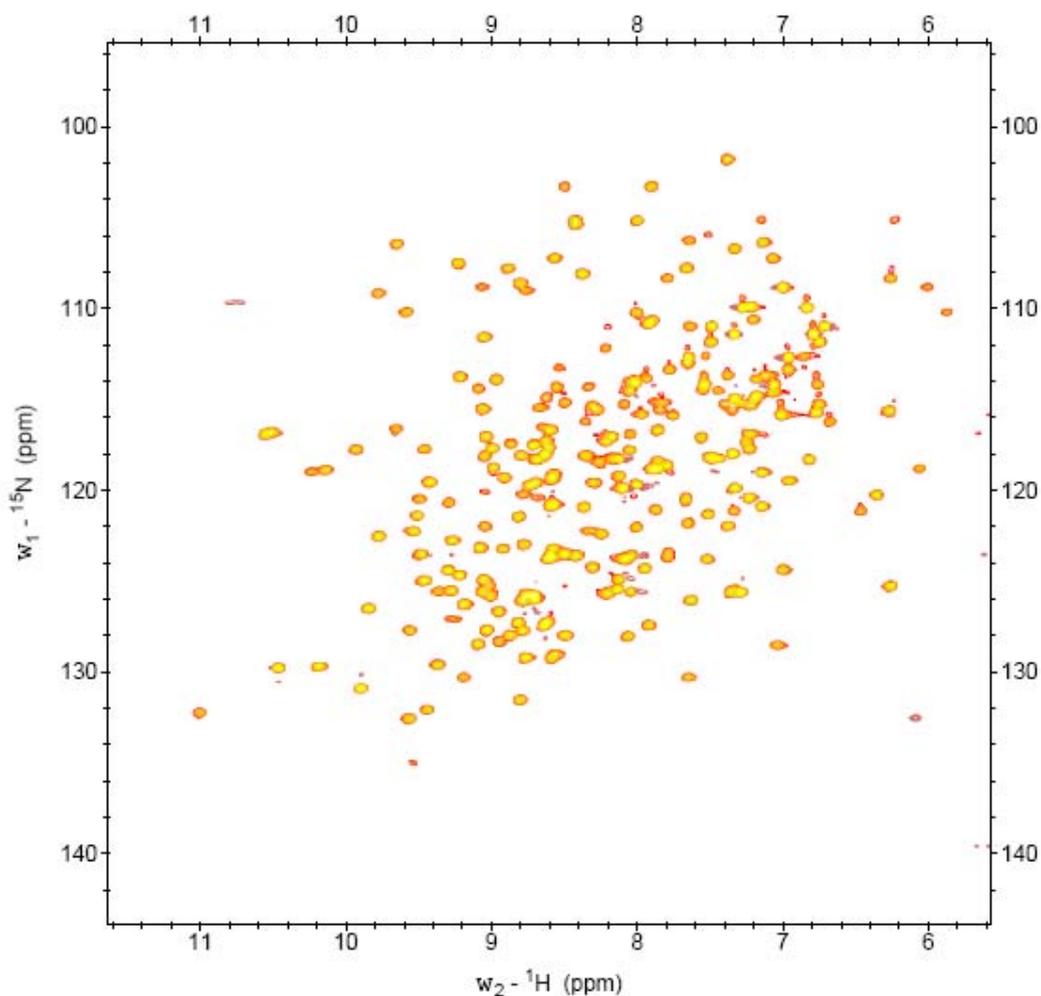


Abb. 34: ^1H - ^{15}N -Korrelationsspektrum von ^{13}C , ^{15}N -*Triple-Ala* Trypsin. Das Spektrum wurde bei einer Frequenz von 750 MHz und einer Temperatur von 27°C aufgenommen. Die Resonanzen waren gut separiert und aufgelöst.

Trotz der guten Qualität der 3D-Spektren der *Triple-Ala* Variante (Abb. 34) war eine vollständige Zuordnung der Kreuzsignale nicht möglich. So konnten Aminosäuren, die in *Loop*- und *Coil*-Bereichen lokalisiert sind, und insbesondere diejenigen, die die 175er-Schleife bilden, nicht zugeordnet werden (Abb. 35 und 36). Auch die Analyse einer deuterierten, doppelt-markierten *Triple-Ala* Proteinprobe (Abb. 37) brachte keinen weiteren Fortschritt. Die Hoffnung war, durch das Ersetzen der austauschbaren Protonen durch Deuterium, eine Vereinfachung der Spektren zu erreichen, um eine weitergehende Zuordnung machen zu können. Dies gelang jedoch nicht.

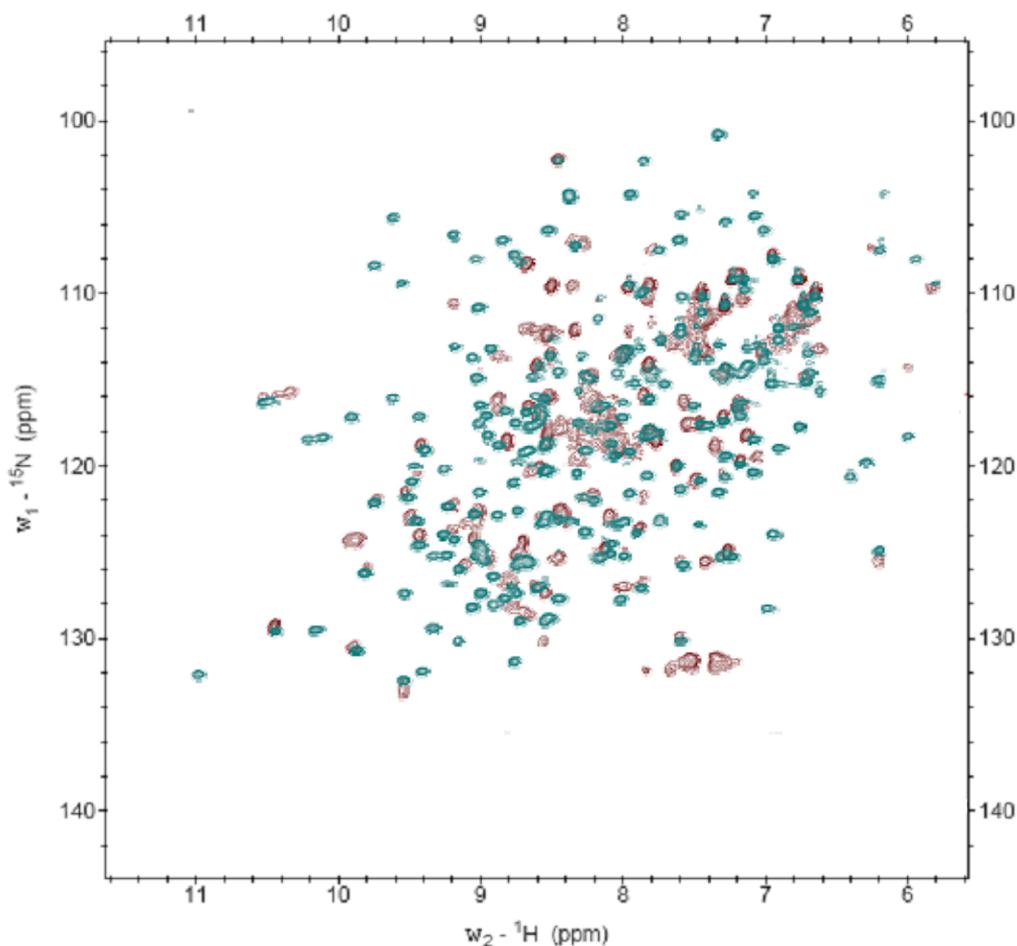


Abb. 37: Überlagerung der ${}^1\text{H}$ - ${}^{15}\text{N}$ Korrelationsspektren von deuteriertem und nicht deuteriertem ${}^{13}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}$ -*Triple-Ala* Trypsin. In blau dargestellt sind die Resonanzen der nicht deuterierten Probe und in braun die des deuterierten Proteins.

Während das 3D-HSQC-Spektrum von ${}^{13}\text{C}$, ${}^{15}\text{N}$ - *Triple-Ala* Trypsin gut aufgelöst war und die Signale klar separiert waren (Abb. 34), wiesen die entsprechenden Spektren der anderen drei doppelt-markierten Trypsin-Varianten zahlreiche Peak-Überlagerungen auf. Dies wird in Abb. 38 am Beispiel der Variante *Triple-Glu-Phe-Ala* gezeigt. Die schlechte Qualität der Spektren könnte möglicherweise auf eine partielle Entfaltung des Proteins zurückzuführen sein.

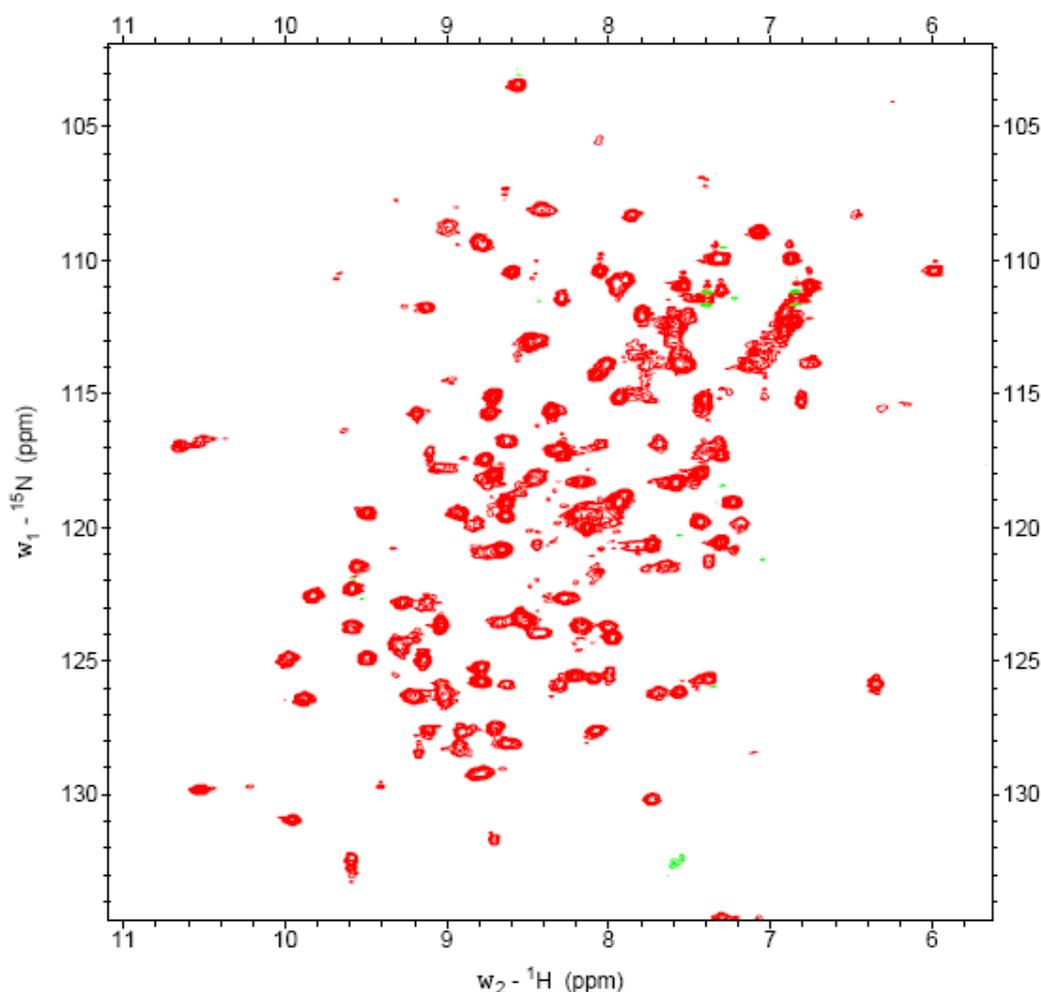


Abb. 38: ^1H - ^{15}N Korrelationsspektrum von ^{13}C , ^{15}N -*Triple-Glu-Phe-Ala* Trypsin. Das Spektrum wurde bei einer Frequenz von 750 MHz und einer Temperatur von 27°C aufgenommen. Im Vergleich zum Spektrum der *Triple-Ala* Variante war das der *Triple-Glu-Phe-Ala* Variante schlecht aufgelöst und zeigte vorwiegend überlappende Kreuzsignale.

4.4 Charakterisierung biomolekularer Wechselwirkungen mittels Kalorimetrie

Kalorimetrische Messungen wurden sowohl zum Studium der thermodynamischen Stabilität der katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten als auch zum Studium der Wechselwirkung von katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten mit der makromolekularen Inhibitorvariante Eglin C-L45K angewandt. Damit sollte der Frage nachgegangen werden, ob sich die strukturellen Unterschiede in der 175er-Schleife zwischen den Trypsin-Varianten auf die Interaktion mit einem makromolekularen Liganden auswirken.

4.4.1 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Die Dynamische Differenzkalorimetrie wurde eingesetzt, um die thermische Stabilität der Trypsin-Varianten unter verschiedenen Bedingungen zu untersuchen. Voraussetzung für die Durchführung von DSC-Messungen ist das Vorhandensein einer homogenen Proteinpräparation, die einen reversiblen Übergang von Faltung und Entfaltung zeigt. Aus irreversiblen Übergängen können keine thermodynamischen Parameter für die Faltungs- / Entfaltungsreaktion bestimmt werden. Dann ist lediglich ein qualitativer Vergleich der Stabilität von Proteinen unter gleichen Pufferbedingungen anhand der beobachteten apparenten Übergangstemperaturen möglich. Aktive Trypsin-Varianten neigten bei Vorversuchen zur temperaturinduzierten Entfaltung zur Aggregation und Autoproteolyse. Zur Unterdrückung des Selbstverdaus erfolgten die DSC-Messungen in dieser Arbeit, wie alle anderen angewandten Methoden auch, deshalb an katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten, wie im Methodenteil beschrieben. Zunächst wurden verschiedene Puffersysteme getestet, um Bedingungen zu finden, bei denen eine reversible Entfaltung der inaktiven Trypsin-Varianten gewährleistet war. Ein Tris-basierter Puffer pH 8,0, in dem alle enzymkinetischen Untersuchungen an aktiven Trypsin-Varianten durchgeführt worden sind (Rauh *et al.*, 2003; 2004), stellte sich aufgrund seiner temperaturinduzierten pH-Änderung als ungeeignet heraus. Ebenso konnte nicht auf Phosphatpuffer zurückgegriffen werden, da dieser mit Kalziumionen, welche für die Stabilität der Trypsin-Varianten essentiell sind (Corey *et al.*, 1992), unlösliches Kalziumphosphat gebildet hätte. Um in einem pH-Bereich zu arbeiten, der dem der enzymkinetischen Analysen entsprach, wurden Entfaltungsstudien in einer Reihe von Puffersystemen in dem pH-Bereich zwischen 7 und 8 durchgeführt. Neben dem pH-Wert spielte auch die Kalziumionenkonzentration eine entscheidende Rolle.

Reversible, temperaturinduzierte Übergänge konnten lediglich für die *Triple-Glu-Ala* Trypsin-Variante in 5 mM Borat/NaOH pH 8,0 mit 1 mM CaCl₂ beobachtet werden (Abb. 39). Die thermische Denaturierung dieser Variante in 5 mM Borat/NaOH pH 8,0 mit 10 mM CaCl₂ war dagegen nur partiell reversibel.

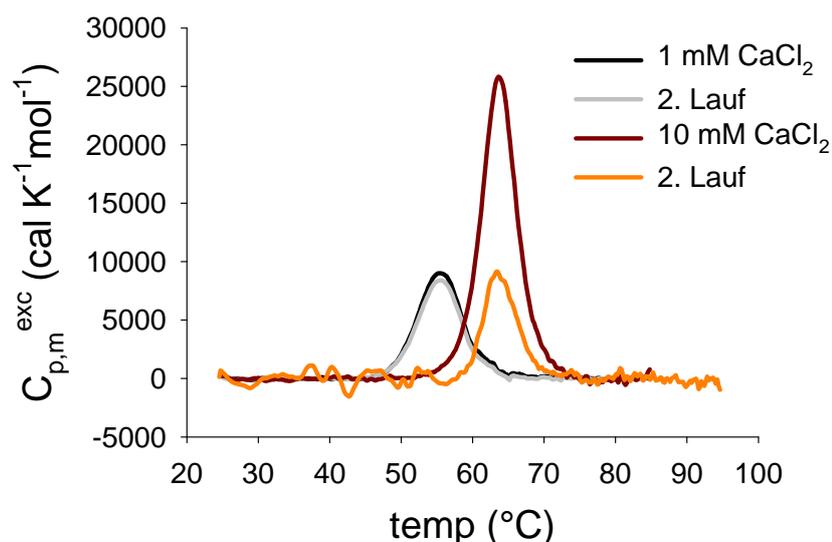
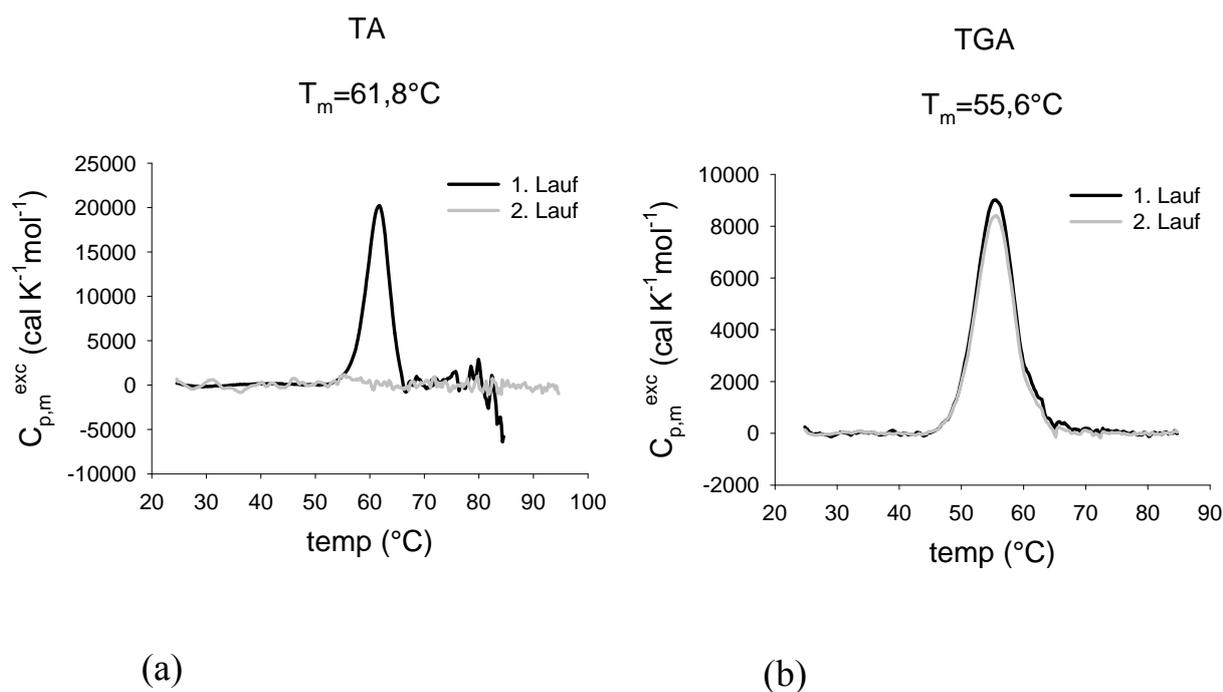


Abb. 39: Beispiel eines reversiblen und irreversiblen DSC-Laufs der *Triple-Glu-Ala Trypsin*-Variante. Das DSC-Signal, d.h. die Wärmekapazitätsänderung zwischen Proben- und Referenzzelle $C_{p,m}^{exc}$ in cal pro K und pro mol, ist gegen die Temperaturänderung in °C aufgetragen. Die schwarze Kurve zeigt den ersten Lauf der TGA-Variante in 5 mM Borat/NaOH pH 8,0, 1 mM $CaCl_2$, die graue Kurve den zweiten. In braun dargestellt ist der erste Lauf der TGA Variante in 5 mM Borat/NaOH pH 8,0, 10 mM $CaCl_2$ und in orange der zweite. Eine Zunahme der Kalziumionenkonzentration führt zur Stabilisierung der TGA-Variante, was sich in einer Erhöhung der apparenten Übergangstemperatur (T_m) von 55,6 °C (mit 1 mM $CaCl_2$) auf 63,6 °C (mit 10 mM $CaCl_2$) widerspiegelt. Allerdings bewirkt die erhöhte Ionenstärke, dass das Protein denaturiert und der zweite Lauf somit nicht mehr reversibel ist.



(a)

(b)

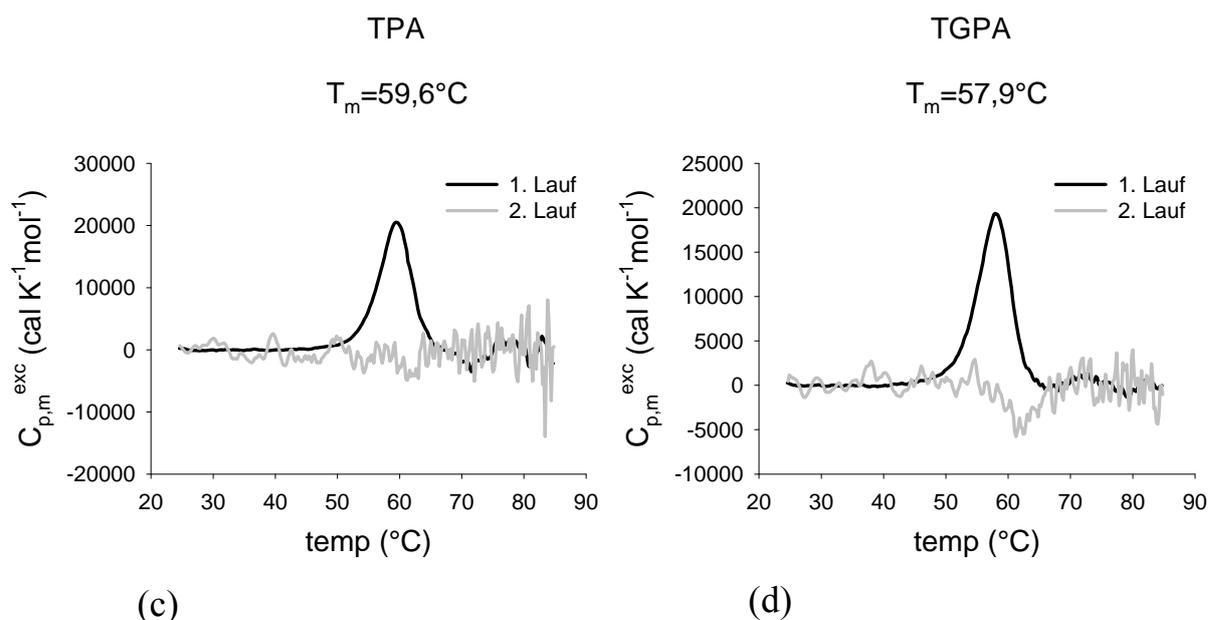


Abb. 40: Graphische Darstellung der mittels DSC beobachteten thermischen Denaturierung der vier ausgewählten Trypsin-Varianten. (a) *Triple-Ala* (TA); (b) *Triple-Glu-Ala* (TGA); (c) *Triple-Phe-Ala* (TPA); (d) *Triple-Glu-Phe-Ala* (TGPA), in 5 mM Borat/NaOH pH 8,0, 1 mM CaCl₂. Das DSC-Signal $C_{p,m}^{exc}$ in cal pro K und pro mol ist gegen die Temperaturänderung in °C aufgetragen. Der erste Proteinlauf ist jeweils als schwarze Kurve angezeigt. Der dazugehörige zweite DSC-Lauf ist in grau dargestellt. Ein reversibler Übergang wurde lediglich für die Variante TGA, (b), beobachtet. Die DSC-Läufe der restlichen drei Trypsin-Varianten waren infolge von Aggregationsprozessen irreversibel.

Die restlichen drei untersuchten Trypsin-Varianten hingegen aggregierten irreversibel, während der thermischen Denaturierung, unter allen getesteten Pufferbedingungen (Abb. 40). In Folge dessen war bei der jeweils zweiten Temperaturrampe nach Abkühlung der Proben kein Signal für die thermische Entfaltung mehr erkennbar. Aufgrund der Irreversibilität war eine quantitative Auswertung der Daten nicht möglich. Zum Vergleich der Stabilitäten der Trypsin-Varianten untereinander können lediglich die apparenten T_m -Werte herangezogen werden, die in 5 mM Borat/NaOH pH 8,0, 1 mM CaCl₂ ermittelt worden sind (Tab. 13). Die niedrigste Übergangstemperatur, mit einem T_m von 55,6°C wurde für die thermisch reversibel entfaltbare Variante *Triple-Glu-Ala* gemessen. Die Trypsin-Varianten mit einem Phenylalanin in Position 227 wiesen in dieser Reihe mittlere T_m -Werte auf. Die *Triple-Glu-Phe-Ala* Trypsin-Variante hatte einen apparenten T_m von 57,9°C, gefolgt von der *Triple-Phe-Ala* Variante mit einem apparenten T_m von 59,6°C. Die höchste apparente Übergangstemperatur besaß die *Triple-Ala* Variante. Mit einem apparenten T_m von 61,8°C war sie die thermisch stabilste der ausgewählten Faktor X-ähnlichen Trypsin-Varianten.

Tab. 13: Apparente Schmelztemperaturen der vier untersuchten Varianten ermittelt mit der Methode DSC.

Variante	T _m (apparent) [°C]
<i>Triple-Ala</i>	61,8
<i>Triple-Glu-Ala</i>	55,6
<i>Triple-Phe-Ala</i>	59,6
<i>Triple-Glu-Phe-Ala</i>	57,9

Da es nicht möglich war, Pufferbedingungen zu finden, unter denen alle vier untersuchten Trypsin-Varianten reversible thermische Entfaltung zeigten, konnte der Einfluß der Bindung der Eglin C-Mutante-L45K auf die Temperaturstabilität der ausgewählten Trypsin-Varianten nicht weiter mittels DSC analysiert werden.

4.4.2 Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC)

Um die thermodynamischen Parameter der Bindung von trypsin-spezifischen Eglin C an die ausgewählten Trypsin-Varianten zu bestimmen, wurde die Methode der Isothermen Titrationskalorimetrie angewendet.

Zuerst wurden quantitative Titrations in HEPES-gepufferter Lösung bei pH 7,5 durchgeführt (Abb. 41). Im Ergebnis wurden schlecht quantifizierbare sub-nanomolare Affinitäten ermittelt. Wegen dieser hohen Affinitäten war es nötig, die Titrations bei niedrigen Proteinkonzentrationen unterhalb von 1 µM durchzuführen, um die Gleichgewichtskonstante der Bindung ermitteln zu können. Das führte jedoch zu kalorimetrischen Titrations mit einem schlechten Signal-Rausch-Verhältnis sowie zu apparenten Stöchiometrien deutlich unter dem erwarteten Wert von 1, wie in Abb. 41 gezeigt. Diese Beobachtung ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass bei der geringen eingesetzten Proteinkonzentration Verluste an eingesetztem Protein durch Absorption an die Wände von Reaktionsgefäßen und Messzelle stattfanden. Bei Titrations unter denselben Bedingungen mit um eine Größenordnung höheren Proteinkonzentrationen konnten dagegen Stöchiometrien nahe 1,0 gemessen werden. Unter diesen Bedingungen war eine zuverlässige Bestimmung von K_A allerdings nicht mehr möglich.

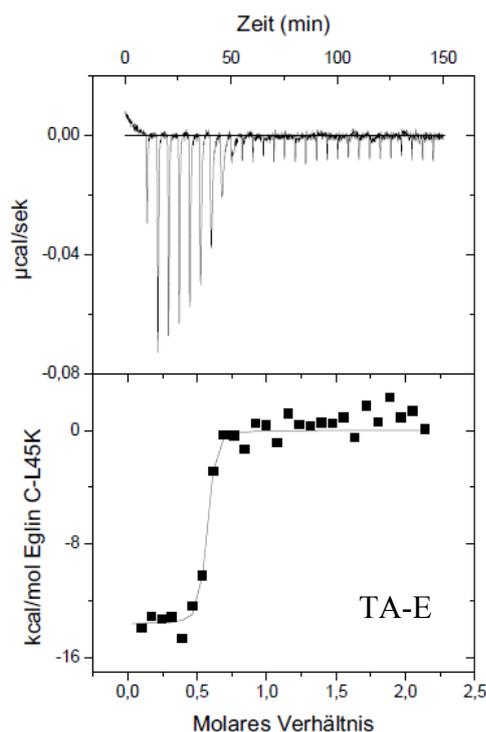
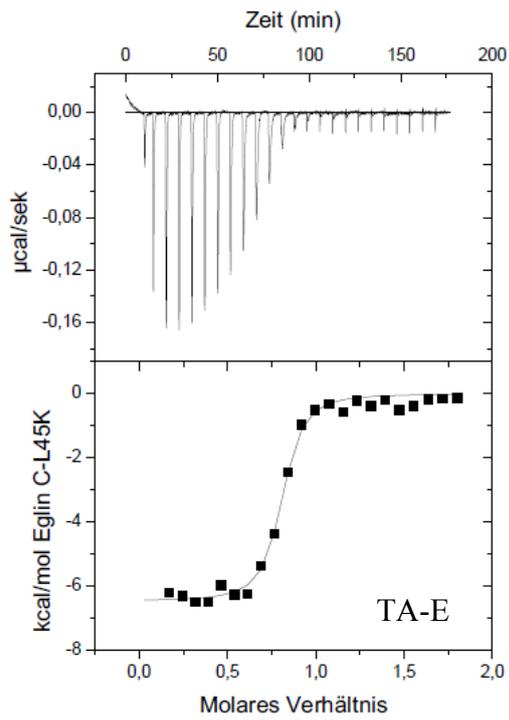
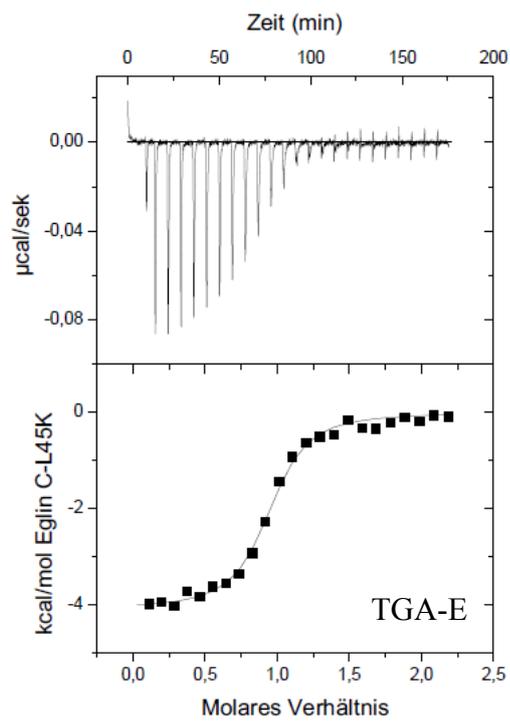


Abb. 41: Kalorimetrische Titration der Variante *Triple-Ala* und der Eglin C-Mutante-L45K in HEPES-gepufferter Lösung. Jeder Peak im oberen Teil der Abbildung entspricht einer einzelnen Injektion des Inhibitors in die Meßzelle mit der Proteaselösung. Die Bindungsreaktion verläuft exotherm. Die Titration wurde in 20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM CaCl₂ durchgeführt, mit 2 µM *Triple-Ala* Trypsin und 20 µM Eglin C. Der ermittelte K_D betrug ~ 0,3 nM.

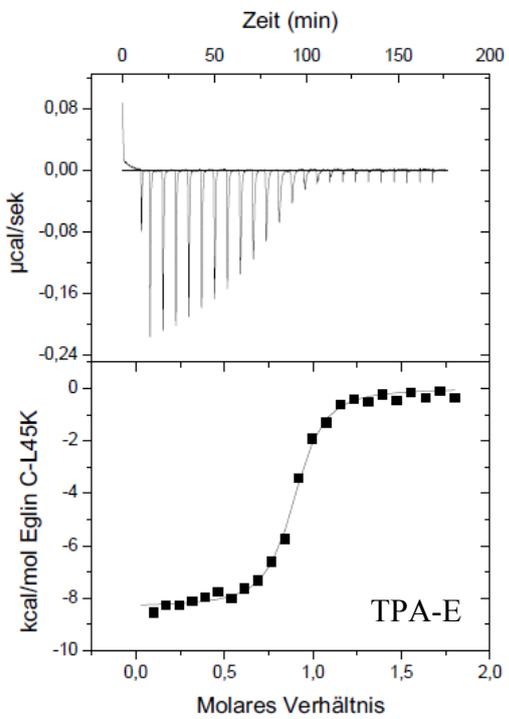
Für systematische Messungen wurde deswegen das Puffersystem 50 mM MES/NaOH pH 6,0, 125 mM NaCl und 1 mM CaCl₂ herangezogen. Unter diesen Bedingungen verringert sich die Affinität der Trypsin-Varianten zu der Eglin C-Mutante um etwa zwei Größenordnungen (Abb. 42). Die Trypsin-Varianten wurden in Konzentrationen, die etwa dem 100-fachen des Wertes der Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D entsprachen, vorgelegt und der Inhibitor in µl-Schritten in einer Konzentration von 70-100 µM zutitriert. Bei den Messungen wurden für alle Trypsin-Varianten apparente Stöchiometrien im Bereich von 0,8 bis 1,0 beobachtet. Diese Werte stehen in Übereinstimmung mit der erwarteten Bildung von 1:1-Komplexen zwischen der Eglin C-Mutante-L45K und den untersuchten Trypsin-Varianten.



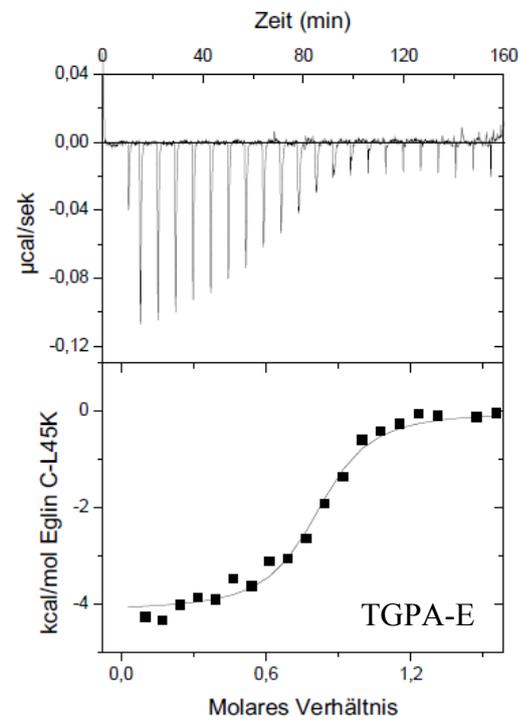
(a)



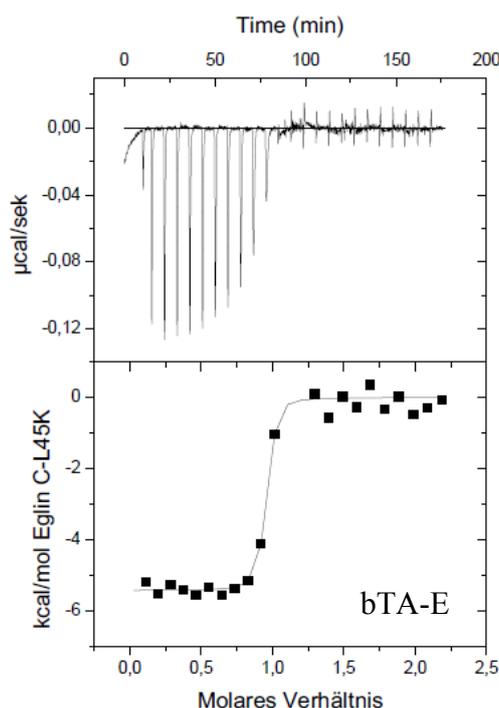
(b)



(c)



(d)



(e)

Abb. 42: Kalorimetrische Titrationsen der ausgewählten Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten bzw. inaktivem Trypsin und der Eglin C-Mutante-L45K in MES-gepufferter Lösung. Wie in Abb. 41 bereits beschrieben, verläuft die Bindungsreaktion exotherm. Die Titrationsen, in 20 mM HEPES/NaOH pH 7,5, 1 mM CaCl₂, ergaben apparente Stöchiometrien von 0,8 bis 1,0. In den Graphen (a) bis (e) sind die entsprechenden Titrationsen mit der Eglin C Mutante L45K und folgenden Proteinproben veranschaulicht: (a) *Triple-Ala*, (b) *Triple-Glu-Ala*, (c) *Triple-Phe-Ala*, (d) *Triple-Glu-Phe-Ala* und (e) inaktivem bovines Trypsin-Ala.

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurden sämtliche Messungen zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Messungen sind in Abb. 43 graphisch dargestellt und in Tab. 14 tabellarisch aufgelistet.

Mittels ITC kann eine Bindungsreaktion vollständig thermodynamisch unter isothermen und isobaren Bedingungen charakterisiert werden. Diese Methode erlaubt, zwischen entropischen und enthalpischen Beiträgen zur Bindung zu differenzieren. Aus den gemessenen Reaktionswärmern lässt sich direkt die Reaktionsenthalpie ΔH_B^0 bestimmen und aus der Form der Titrationskurve die Affinität K_D bzw. ΔG_B^0 . Aus der Differenz $\Delta G_B^0 - \Delta H_B^0$ kann dann der Entropieterm $-T\Delta S_B^0$ erhalten werden.

Die Assoziationsgleichgewichtskonstante K_A , die dem reziproken Wert der Dissoziationsgleichgewichtskonstanten K_D ($K_D = 1 / K_A$) entspricht, ist ein Maß für die Bindungsaffinität zwischen den Trypsin-Varianten und trypsin-spezifischem Eglin C (Abb. 43). Inaktives, bovines Trypsin wies die höchste beobachtete Affinität für die Eglin

C-Mutante-L45K- auf ($K_D = 30$ nM), gefolgt von der *Triple-Ala* Variante ($K_D = 47$ nM), während die Faktor-Xa ähnliche Trypsin-Variante *Triple-Glu-Phe-Ala* die geringste Bindungsaffinität für die Eglin C-Mutante zeigte ($K_D = 140$ nM). Mit Werten von $K_D = 124$ nM und $K_D = 79$ nM zeigten die Varianten *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Phe-Ala* eine gegenüber bovinem Trypsin deutlich reduzierte Affinität für den Proteaseinhibitor. Die angegebenen K_D -Werte stellen Mittelwerte aus jeweils zwei durchgeführten Messungen dar (Tab. 14).

Inaktives, bovines Trypsin und die Varianten *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Glu-Phe-Ala* hatten eine erniedrigte Bindungsenthalpie, die allerdings durch eine erhöhte Bindungsentropie kompensiert wurde, wohingegen *Triple-Ala* und *Triple-Phe-Ala* eine reduzierte Bindungsenthalpie zeigten, die mit einer hohen Bindungsentropie einherging. Besonders deutlich ist dieser Effekt bei der Bindung von *Triple-Phe-Ala* Trypsin und der Eglin C-Mutante-L45K zu beobachten.

Aufgrund des Phänomens der Enthalpie-Entropie-Kompensation (Li *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 2008), welches weit verbreitet in Systemen mit nicht-kovalenter Wechselwirkungen ist (Bjelic & Jelesarov 2008), wird allerdings dafür gesorgt, dass trotzdem für alle fünf untersuchten Wechselwirkungen ein ähnlicher Betrag an Freier Energie der Bindung ΔG_B^0 herauskommt.

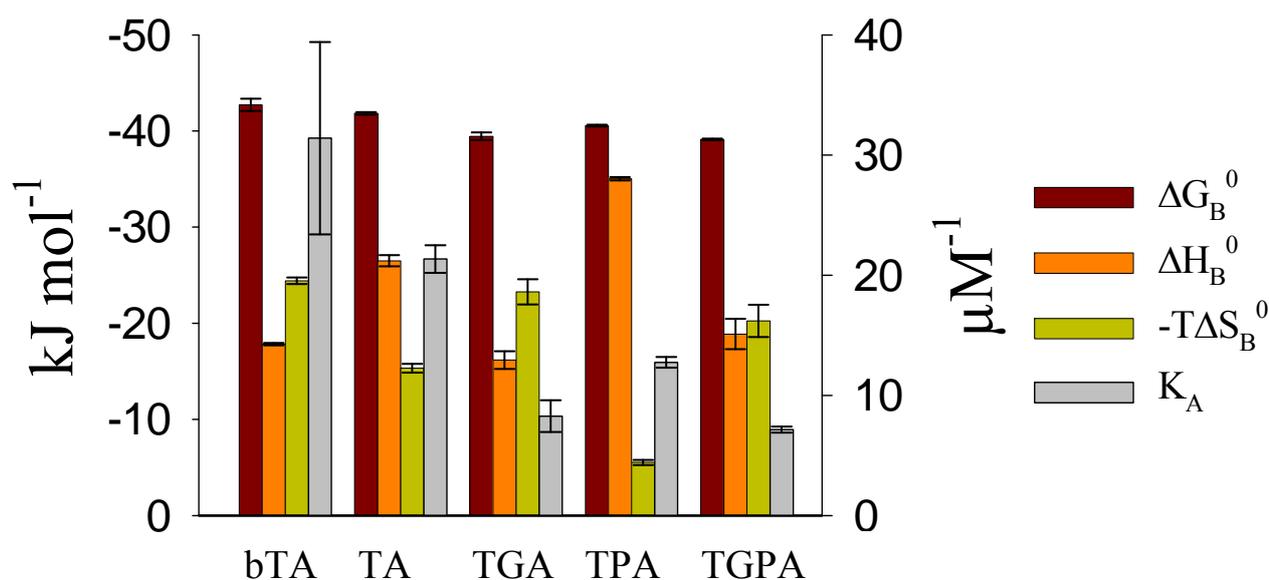


Abb. 43: Thermodynamische Parameter der Bindung von inaktivem bovinem Trypsin bzw. der vier ausgewählten katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten an trypsin-spezifischem Eglin C. Aufgetragen sind die Freien Energien der Bindung ΔG_B^0 (rotbraun), die Bindungs-

enthalpien ΔH_B^0 (orange), die Entropieterme $-T\Delta S_B^0$ (grün, linke Achse, kJ mol^{-1}) sowie die Assoziationsgleichgewichtskonstanten K_A (grau, rechte Achse, μM^{-1}). Die Trypsin-Varianten sind wie folgt abgekürzt: bT – bovinen Trypsin Ala; TA – *Triple-Ala*; TGA – *Triple-Glu-Ala*; TPA – *Triple-Phe-Ala*; TGPA – *Triple-Glu-Phe-Ala*. Die Daten wurden bei 25°C in 50 mM MES/NaOH pH 6,0, 125 mM NaCl, 1 mM CaCl_2 ermittelt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, aus denen die Mittelwerte berechnet und aufgetragen wurden. Die schwarzen Fehlerbalken geben den jeweils höchsten und niedrigsten Messwert an.

Tab. 14: Tabellarische Auflistung der thermodynamischen Parameter der Bindung von inaktivem bovinem Trypsin bzw. der vier ausgewählten katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten an trypsin-spezifischem Eglin C. Es sind jeweils die Mittelwerte aus zwei Messungen und die Abweichung zu den Meßwerten angegeben.

Komplex	$K_A [\mu\text{M}^{-1}]^{-1}$	$\Delta G_B^0 [\text{kJ mol}^{-1}]^{-1}$	$\Delta H_B^0 [\text{kJ mol}^{-1}]^{-1}$	$-T\Delta S_B^0 [\text{kJ mol}^{-1}]^{-1}$
bTA-E	$31,4 \pm 8,0$	$-42,8 \pm 0,6$	$-17,8 \pm 0,1$	$-24,4 \pm 0,3$
TA-E	$21,4 \pm 1,1$	$-41,8 \pm 0,1$	$-26,5 \pm 0,6$	$-15,3 \pm 0,4$
TGA-E	$8,3 \pm 1,3$	$-39,5 \pm 0,4$	$-16,2 \pm 0,9$	$-23,3 \pm 1,3$
TPA-E	$12,8 \pm 0,5$	$-40,6 \pm 0,09$	$-35,0 \pm 0,2$	$-5,5 \pm 0,3$
TGPA-E	$7,2 \pm 0,3$	$-39,1 \pm 0,09$	$-18,9 \pm 1,6$	$-20,2 \pm 1,7$

Eine Untersuchung der thermodynamischen Bindungsparameter von kommerziellem bovinem Faktor Xa und trypsin-spezifischem Eglin C mittels ITC erwies sich aufgrund der sehr geringen Bindungsaffinität als nicht durchführbar.

4.5 Faktor Xa-Inhibitionsassay

Um weitere Informationen über die Stärke der Bindung von bovinem Faktor Xa und trypsin-spezifischem Eglin C zu gewinnen, wurde ein photometrischer Inhibitionsassay durchgeführt (siehe Kapitel 3.4). Im Gegensatz zu ITC-Messungen werden für enzymatische Assays aufgrund ihrer höheren Sensitivität im Allgemeinen geringere Volumina und Konzentrationen der zu untersuchenden Proteinproben benötigt. Der eingesetzte Assay beruhte auf der Hydrolyse des chromogenen Substrates *Pefachrome tPA*, unter Freisetzung von *p*-Nitroanilin und der daraus resultierenden Änderung der Extinktion bei 405 nm. Die Verringerung des zeitabhängigen Anstiegs der Extinktion in Gegenwart der EglinC-Mutante-L45K wurde als Maß für die inhibierende Wirkung von Eglin C verwendet. Es wurde Faktor Xa allein und in Anwesenheit von Eglin C-L45K gemessen und mit bovinem Trypsin verglichen.

Wie in Abb. 44 gezeigt ist, wurde bovinen Trypsin vollständig durch die eingesetzte Konzentration an trypsin-spezifischem Eglin C inhibiert. Boviner Faktor Xa hingegen wurde nur partiell inhibiert. Demgemäß war trypsin-spezifisches Eglin C kein effektiver

Inhibitor für Faktor Xa. Aus den Ergebnissen des Inhibitionsassays ließ sich bei den eingesetzten Konzentration an Protein und Inhibitor die Affinität von trypsin-spezifischem Eglin C für bovinen Faktor Xa ungefähr abschätzen: Sie betrug weniger als 10 mM^{-1} . Die geringe inhibitorische Wirkung steht im Einklang mit der nicht-beobachtbaren Bindung der Eglin C-Mutante-L45K an Faktor Xa in den ITC-Experimenten.

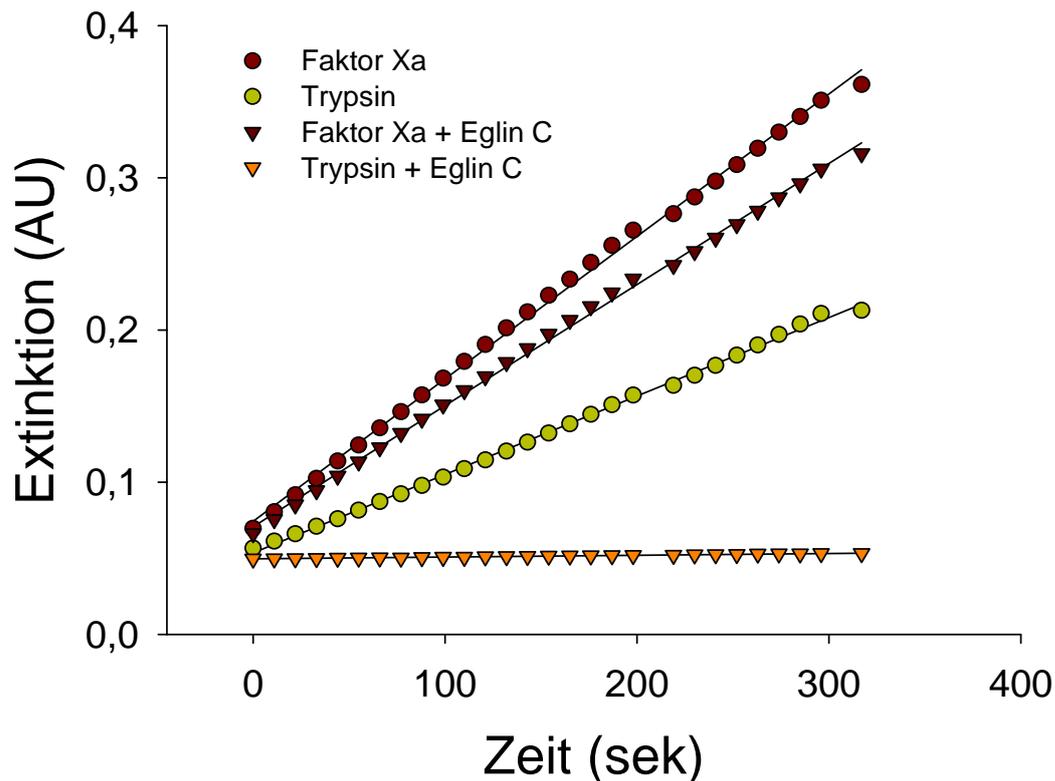


Abb. 44: Enzymkinetischer Inhibitionsassay. Der Graph zeigt den Extinktionsverlauf bei 405 nm in Abhängigkeit von der Zeit. Es sind jeweils die Mittelwerte aus zwei Einzelmessungen dargestellt. Der Verlauf ist für Faktor Xa allein mit braunen Kreisen und für Trypsin allein mit hellgrünen Kreisen dargestellt. Faktor Xa mit Eglin C-L45K ist mit dunkelbraunen Dreiecken gezeigt, Trypsin mit Eglin C-L45K mit orangen Dreiecken. Mittels linearer Regression wurde der Anstieg bestimmt. Die ermittelten Kurvenanstiege waren $9,35 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ für Faktor Xa allein, und $7,96 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ in Gegenwart der Eglin C-L45K Mutante. Der Anstieg für Trypsin allein betrug $5,15 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ und für Trypsin in Gegenwart der Eglin C-Mutante $1,20 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden vier Komplexe von Faktor Xa-ähnlichen Varianten der Serinprotease Trypsin mit dem makromolekularen Inhibitor Eglin C (Mutation L45K) strukturell analysiert. Zusätzlich zu den Strukturanalysen wurden die Komplexe thermodynamisch mittels ITC untersucht. Das Ziel der Arbeit war, die in den Trypsin-Varianten vorhandene strukturelle Flexibilität zu dem Vorgang und der Thermodynamik der Komplexbildung mit Eglin C in Beziehung zu setzen. Die Arbeit stellt eine Weiterführung bisheriger Arbeiten über die Komplexbildung der Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten dar. Während in früheren Arbeiten lediglich niedermolekulare Moleküle als Liganden der Trypsin-Varianten zum Einsatz kamen, wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal ein makromolekularer Ligand untersucht.

Um die verschiedenen in dieser Arbeit angewandten Methoden in ein Gesamtbild zu bringen, erscheint es hilfreich, das untersuchte System anhand Abb. 45 zu veranschaulichen.

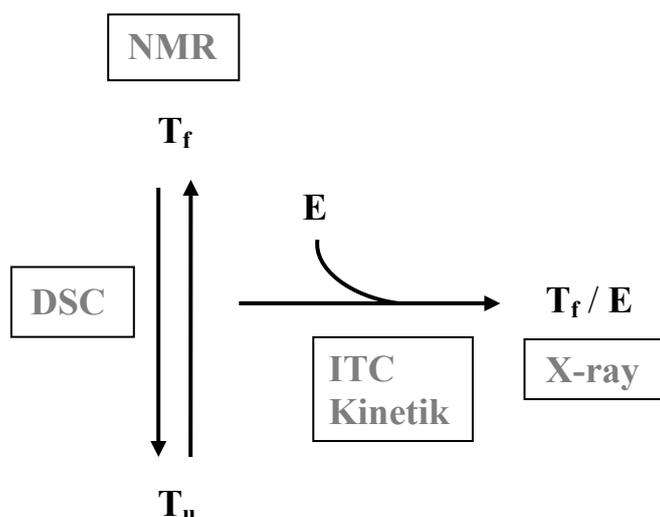


Abb. 45: Das mit verschiedenen Methoden untersuchte Trypsin-Eglin C-System. T_f : vollständig gefaltetes Trypsin, T_u : ungefaltetes Trypsin, E: Eglin C-Mutante-L45K, T_f/E : Komplex aus Trypsin bzw. einer der hier untersuchten Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante-L45K.

In wässriger Lösung liegt ein Gleichgewicht von vollständig gefaltetem Trypsin T_f und partiell aufgefaltetem Trypsin T_u vor (Trypsin steht für sämtliche untersuchte Trypsin-Varianten inklusive des nativen bzw. katalytisch inaktiven Trypsins und Faktor Xa).

Dieses Gleichgewicht wurde mittels DSC und NMR untersucht. Bei Zugabe von trypsin-spezifischem Eglin C erfolgt eine Komplexbildung mit gefaltetem Trypsin (T_f/E).

Die Thermodynamik dieser Komplexbildung wurde mittels ITC sowie enzymkinetischer Messungen untersucht und die drei-dimensionalen Strukturen der gebildeten Komplexe wurden mittels Röntgenkristallographie und bioinformatischer Methoden analysiert.

Bevor im Folgenden die Strukturen der Komplexe diskutiert werden, sollen zunächst die Ergebnisse zur Stabilität der vier eingesetzten katalytisch inaktiven Trypsin-Varianten *Triple-Ala*, *Triple-Glu-Ala*, *Triple-Phe-Ala* und *Triple-Glu-Phe-Ala* beleuchtet werden. Informationen über die Stabilität wurden im Rahmen dieser Arbeit im Wesentlichen aus NMR- und aus DSC-Messungen erhalten.

Die dreidimensionalen NMR-spektroskopischen Analysen wurden an doppelt-markierten Trypsin-Varianten durchgeführt. Im Unterschied zu früheren NMR-spektroskopischen Untersuchungen an bovinem Trypsin(ogen) (Peterson *et al.*, 2001) waren die Spektren von guter Qualität und wiesen eine Resonanzverteilung auf, die im Prinzip Anlass zur Hoffnung für eine vollständige Zuordnung gaben. In Bezug auf die Auflösung der NMR-Signale war das an der *Triple-Ala* Trypsin-Variante aufgenommene Spektrum bei weitem das Beste (siehe Abb. 34). Die von den anderen drei Varianten aufgenommenen Spektren zeigten zum Teil überlappende Kreuzsignale und Anzeichen von unvollständiger Faltung der Proteine (Elizabeth Dowler, persönliche Mitteilung). Ob dies an der doppelten Markierung der Trypsin-Varianten lag, an der Pufferbedingung oder an der relativ hohen NMR-Datenaufnahmetemperatur von 27°C, konnte nicht zufriedenstellend geklärt werden. Leider reichte selbst das offensichtlich gute Spektrum, welches an der *Triple-Ala* Trypsin-Variante aufgenommen werden konnte (siehe Abb. 34) nicht aus, um eine vollständige Zuordnung der Resonanzen zu ermöglichen (siehe Abb. 35 & 36). Insbesondere konnten die Kreuzsignale der flexiblen 175er-Schleife nicht eindeutig identifiziert werden. Da somit die Grundvoraussetzung nicht gegeben war, um die Dynamik der Trypsin-Varianten einerseits und deren Wechselwirkungen mit Inhibitoren andererseits per NMR zu untersuchen, wurden die NMR-Experimente ab diesem Zeitpunkt nicht mehr weiter verfolgt.

Einen weiteren Ansatz, um an Stabilitätsinformation zu gelangen, bietet die DSC. Wie bereits im Ergebnisteil erwähnt, war es allerdings nicht möglich, Pufferbedingungen für die DSC-Versuche zu finden, unter denen alle vier untersuchten Trypsin-Varianten

reversible thermische Entfaltung zeigten. Grundsätzlich ist es jedoch möglich, diese irreversiblen Faltungs- bzw. Entfaltungsübergänge zu analysieren (Kurganov *et al.*, 1997); allerdings werden für solche Experimente so hohe Konzentrationen an Protein benötigt, dass dies aufgrund der Renaturierungsmethodik des hier vorliegenden Systems nicht realistisch war und keinen gangbaren Weg darstellte. Aus diesem Grund konnte der Einfluß der Bindung der Eglin C-Mutante-L45K auf die Temperaturstabilität der ausgewählten Trypsin-Varianten nicht weiter mittels DSC analysiert werden. Ein dennoch aus der DSC erhaltenes wichtiges Ergebnis betrifft die apparenten Übergangstemperaturen der vier verwendeten Trypsin-Varianten. Die Variante *Triple-Ala* (die im Komplex *TA-E* verwendete) erwies sich dabei als die stabilste, gefolgt von der Variante *Triple-Phe-Ala* (Variante im Komplex *TPA-E*). Die Varianten *Triple-Glu-Phe-Ala* (im Komplex *TGPA-E*) und *Triple-Glu-Ala* (im Komplex *TGA-E*) wiesen die niedrigste Stabilität auf. Interessanterweise zeichnen sich die beiden am wenigsten stabilen Mutanten durch die Mutation Ser217Glu aus. Die relative niedrige thermische Stabilität von *Triple-Phe-Ala* Trypsin erscheint hierbei etwas überraschend aufgrund der in der 175er-Schleife beobachteten Flexibilität. Dies soll allerdings später noch im Detail beleuchtet werden.

Alle vier Strukturen *TA-E*, *TGA-E*, *TPA-E* und *TGPA-E* wurden mit der Methode des Molekularen Ersatzes gelöst und gegen die gemessenen Röntgenstreudaten verfeinert. Da in der asymmetrischen Einheit der monoklinen Kristalle jeweils zwei vollständige Komplexe aus einer Trypsin-Variante und einer Eglin C-Mutante-L45K vorliegen, stehen nun insgesamt acht Komplexe zur Analyse und Diskussion zur Verfügung. Eine Überlagerung aller Strukturen ergab, dass alle acht Komplexe eine im Wesentlichen identische Struktur aufweisen. Strukturelle Änderungen wurden lediglich an drei Stellen in den Trypsin-Varianten beobachtet: in der räumlichen Umgebung der Mutation Ser217Glu in den zwei Varianten *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Glu-Phe-Ala*, in der 175er-Schleife und in der 99er-Schleife der Trypsin-Varianten.

Die strukturelle Änderung der Seitenkettenkonformation des Tyr99 in der 99er-Schleife aller untersuchten Trypsin-Varianten im Komplex mit der Eglin C-Mutante-L45K resultiert vermutlich aus einem sterischen Konflikt mit der Seitenkette des P2-Restes Thr44 in der Proteasenbindeschleife des Inhibitors (siehe Abb. 33). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Untersuchungen am Kallikrein-BPTI-Komplex (Chen & Bode,

1993), in dem die Seitenkette von Tyr99 aufgrund des sterischen Einflusses einer Disulfidbrücke des BPTIs eine Konformationsänderung eingeht.

Eine leichte Verschiebung der Hauptkette des Inhibitors konnte in der räumlichen Umgebung der Mutation Ser217Glu beobachtet werden. Diese ist allerdings naturgemäß auf die Varianten *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Glu-Phe-Ala* beschränkt, mit denen die Komplexe *TGA-E* und *TGPA-E* gebildet wurden. In diesen Trypsin-Varianten ist die Aminosäure Ser217 durch Glutaminsäure, die in Faktor Xa an dieser Position vorkommt, ersetzt. Aufgrund der deutlich größeren Seitenkette an Position 217 kommt es zu einer leichten Verschiebung der Eglin C-L45K-Hauptkette bei Bindung an diese zwei Trypsin-Varianten (siehe Abb. 31). Mögliche Ursache für diese leichte Hauptkettenverschiebung ist die fehlende Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Seitenkettenatom OG von Ser217 in Trypsin und dem Hauptketten-carbonylsauerstoffatom O von Gly40 in der Eglin C-Mutante-L45K, wie sie in *Triple-Ala* und *Triple-Phe-Ala* zu finden (siehe Anhang Tab. A2). Auf die Gesamtstabilität der beiden Komplexe scheint das Fehlen dieser Wasserstoffbrückenbindung und die daraus resultierende Strukturänderung jedoch keinen oder nur einen sehr geringen Einfluß zu haben. Allerdings können aus der Ser217Glu-Mutation Ladungsänderungen in den Trypsin-Varianten resultieren, die möglicherweise zu Unterschieden in der Verteilung der enthalpischen und entropischen Beiträge zur Komplexbildung mit der Eglin C-Mutante in den ITC-Experimenten führen.

Auf diesen Aspekt wird in der weiteren Diskussion nochmals zurückgegriffen. Zunächst jedoch soll der Einfluß der Eglin C-Bindung auf die Konformation der 175er-Schleife der Varianten des Trypsins beleuchtet werden. Die Flexibilität der 175er-Schleifen in den Trypsin-Varianten stellt den wichtigsten Punkt der vorliegenden Arbeit dar. In den vier untersuchten Proteinkomplexen (Komplex *TA-E* bis *TGPA-E*) wurden die Konformationen von Phe174 bzw. der intermediären Helix als *down*, *down*, ungeordnet und *up* identifiziert, wobei durch sterische Wechselwirkungen mit Pro42 der Eglin C-Mutante die Seitenkette von Phe174 wegrotiert (siehe Abb. 32) und die *up*-Konformation im Komplex *TGPA-E*, im Vergleich zu der in Faktor Xa beobachteten, damit leicht verändert ausfällt. Diese beobachteten Konformationen von Phe174 und der intermediären Helix stehen im Einklang mit den bisher untersuchten Kristallstrukturen der vier Trypsin-Varianten im Komplex mit niedermolekularen Inhibitoren (Reyda *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2004; Tziridis, 2008; siehe Anhang Tab. A1). Sie untermauern die

Tatsache, dass die dreidimensionalen Konformationen der Trypsin-Varianten und insbesondere die der 175er-Schleifen abhängig sind von der Aminosäuresequenz und der Ligandenbindung. Die kristallographische Umgebung der Komplexe aus Trypsin-Varianten und Inhibitoren, mit offensichtlicher Ausnahme des AB-Komplexes in *TPA-E*, scheint keine entscheidende Rolle zu spielen, da die gleichen Trypsin-Konformationen in Bezug auf die intermediäre Helix mit der 175er-Schleife unabhängig von der Raumgruppe, d.h. der Packung der Moleküle im Kristallgitter, auftreten (siehe Anhang Tab. A1).

Um die in der Arbeit erhaltenen Strukturen zu den nicht experimentell bestimmten Komplexen aus bovinem Trypsin bzw. der katalytischen Domäne von Faktor Xa und der Eglin C-Mutante in Beziehung zu setzen, wurden diese beiden Komplexe modelliert. Der deutlich reduzierte Gewinn an freier Solvatationsenergie, Δ^1G , (siehe Tab. 12) und die geringe Affinität bei der Ausbildung des Modellkomplexes aus der katalytischen Domäne von Faktor Xa und der Eglin C-Mutante-L45K (siehe Kapitel 4.5), verglichen mit dem hypothetischen Komplex aus nativem Trypsin und trypsin-spezifischem Eglin C, ist auf mehrere Aspekte zurückzuführen. Eine primäre Funktion könnte dabei der 60er-Schleife des zukommen, die eine von drei Oberflächenschleifen (39er-, 60er- und 148er-Schleife) im Faktor Xa ist und in der Ligandenbindung involviert ist (Padmanabhan *et al.*, 1993; Brandstetter *et al.*, 1996; Burgering *et al.*, 1997). Durch ihren direkten polaren Kontakt zu der S2-Tasche erschwert die 60er-Schleife die Zugänglichkeit von sperrigen Substraten oder Inhibitoren. Ein weiterer, aber womöglich sekundärer Aspekt, ist in der unterschiedlichen primären Substratspezifität von Trypsin und Faktor Xa (siehe Kapitel 1.8) zu suchen. Durch den Austausch von Ser190 gegen Alanin ist in Faktor Xa die Spezifität von Lysin zu Arginin in Position P1 des Substrates verschoben. Des Weiteren bevorzugt Faktor Xa aufgrund seiner sperrigen 99er-Schleife, in P2-Position des Substrates kleine Aminosäurereste. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Eglin C-Mutante-L45K erfüllt durch die Aminosäurereste Lys45 in P1 und Thr44 in P2 beide Anforderungen nicht. Damit kann sich vermutlich zum einen keine Salzbrücke zwischen Lys45 in Eglin C und Asp189 am Boden der S1-Bindetasche in Faktor Xa ausbilden. Zum Anderen wird durch die sterische Hinderung zwischen Thr44 in der Eglin C-Mutante und Tyr99 der 99er-Schleife in Faktor Xa die Zugänglichkeit zur S2-Tasche erschwert. Diese und weitere Ursachen mögen der Grund dafür sein, dass die die Affinität

von Faktor Xa zu trypsin-spezifischem Eglin C so sehr vermindert ist, dass die Eglin C-Mutante-L45K keinen potenten Inhibitor für Faktor Xa mehr darstellt.

Um die Thermodynamik der Komplexbildung zwischen den vier ausgewählten Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten und der Eglin C-Mutante-L45K zu untersuchen, wurden ITC-Messungen durchgeführt. Aus den ITC-Messungen (siehe Abb. 43) ergeben sich nahezu identische Freie Energien (und damit Assoziationskonstanten) für die Komplexbildung von katalytisch inaktivem Trypsin-Ala und den vier Trypsin-Varianten mit der Eglin C-Mutante-L45K. Spaltet man die Freien Energien jedoch in entropische und enthalpische Beiträge auf, zeigen sich starke Variationen zwischen den einzelnen Komplexen. Dieses Phänomen wird in der Literatur unter dem Begriff Enthalpie-Entropie-Kompensation zusammengefasst (Dunitz, 1994; Cornish-Bowden, 2002).

Um die ITC-Daten in Beziehung zu den dreidimensionalen Strukturen zu setzen, ist es hilfreich, sich den Vorgang der Komplexbildung vor Augen zu führen. In wässriger Lösung liegen beide Komplexpartner für sich im Grundzustand vor. Beide Partner sind zudem vollständig solvatisiert. Bei der Ausbildung des Komplexes kann es dann zum Einen zu einer Konformationsänderung in einem der Partner oder in beiden kommen, und zum anderen zu einer Freisetzung von Wassermolekülen. Diese beiden Effekte sollen getrennt voneinander betrachtet werden. Entspricht der Grundzustand der Komplexpartner den jeweiligen Konformationen im Komplex, würde die Komplexbildung nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip verlaufen. Auf Seiten der Makromoleküle käme es dabei zu einer vernachlässigbaren Entropieänderung. Der Hauptentropiebeitrag bei der Komplexbildung käme dann von den freigesetzten Wassermolekülen. Im unkomplexierten Zustand binden Wassermoleküle an den für die Komplexbildung beteiligten Oberflächen, während im Komplexzustand diese Wassermoleküle freigesetzt und somit ungeordnet sind. Dies führt zu einer Zunahme an Entropie. Kommt es vor oder bei der Komplexbildung zu einer Konformationsänderung in einem der Bindungspartner oder in beiden spricht man von Komplexbildung durch konformationelle Selektion bzw. durch induzierten Fit. Nimmt dabei die Ordnung zu, geht dies einher mit einem Entropieverlust. Der Beitrag des Wassers sollte in diesem Fall ähnlich dem oben diskutierten Fall sein.

Leider sind nicht alle dreidimensionalen Strukturen der jeweiligen beiden isolierten Komplexpartner nicht bekannt. Lediglich die Varianten *Triple-Ala* und *Triple-Glu-Ala* wurden strukturell ohne Ligand aufgeklärt. In beiden Fällen liegt die *down*-Konformation

der 175er-Schleife vor (Menzel, 2004). Für die anderen Varianten muss demgemäß angenommen werden, dass die Trypsin-Varianten-Strukturen in Komplex mit niedermolekularen Liganden in ihrer Struktur den nicht-komplexierten Trypsin-Varianten entsprechen. Außerdem wird angenommen, dass die Struktur der Eglin C-Mutante-L45K im Komplex gleich der Struktur von unkomplexiertem Eglin C-L45K ist. Ein Indiz für die Richtigkeit dieser Vermutung ist die Tatsache, dass die Gesamtstruktur von Eglin C-L45K im Komplex identisch ist zu der Struktur von nativem Eglin C (Hipler *et al.*, 1992).

Damit kann dann versucht werden, die ITC-Daten mit den dreidimensionalen Strukturen der Komplexe zu korrelieren. Eine Überlagerung von bovinem Trypsin ohne Inhibitor, einer Trypsin-Variante im Komplex mit Benzamidin sowie der Trypsin-Variante aus dem in dieser Arbeit untersuchten Komplex *TA-E* ergab keine nennenswerten strukturellen Änderungen im Trypsin (nicht gezeigt). Die einzige Auffälligkeit in der Strukturüberlagerung zeigte sich in der Gegend der 175er-Schleife, die im nativen Trypsin keine Flexibilität aufweist. Dies bedeutet, dass weder trypsin-spezifisches Eglin C noch der niedermolekulare Ligand Benzamidin bei Bindung an Trypsin und Komplexbildung eine Konformationsänderung im Trypsin induziert. Damit scheint die oben gemachte Annahme der Strukturgleichheit von komplexiertem und unkomplexiertem Trypsin weitgehend gerechtfertigt. Ob dies für den Liganden Eglin C ebenfalls gerechtfertigt ist, lässt sich nicht ohne weiteres überprüfen, da es von der Struktur des nativem Eglin Cs ohne Bindungspartner von Hipler *et al.*, (1992) keine in der Proteinstrukturdatenbank (PDB) hinterlegten Koordinaten gibt. Die einzige Kristallstruktur von Eglin C in der PDB, in der Eglin C ohne Bindungspartner vorliegt, ist die von Betzel *et al.*, (1993) publizierte. In dieser Struktur (PDB-Eintrag: 1EGP) liegt Eglin C allerdings zwischen den Aminosäuren 45 und 46 hydrolysiert vor. Diese Struktur ist damit für die hier beschriebene Analyse nicht geeignet.

Im Folgenden sollen die thermodynamischen Ergebnisse aus den ITC-Messungen für die einzelnen Komplexe diskutiert werden. Da sich die beiden Varianten mit Ser217 durch einen deutlich geringeren entropischen Beitrag zur Bindung auszeichnen, der dann allerdings mit einem erhöhten enthalpischen Beitrag einhergeht, wird zunächst versucht, diese Parameter in Bezug zur Struktur zu setzen:

Komplex *TA-E*. Die Freie Energie der Bildung des *TA-E*-Komplexes setzt sich aus einem erhöhten Enthalpiebeitrag ($\Delta H_B^0 = -26,5 \text{ kJ mol}^{-1}$) zusammen, der mit einer Erniedrigung

des Entropiebeitrages einhergeht ($-T\Delta S_B^0 = -15,3 \text{ kJ mol}^{-1}$). Demnach ist die Ligandenbindung enthalpisch begünstigt. Da die 175er-Schleife der *Triple-Ala* Variante im freien als auch im gebundenen Zustand immer in der *down*-Konformation vorliegt, kommt es bei Komplexbildung zu keinem Gewinn oder Verlust an Freiheitsgraden. Der Entropiebeitrag zur Freien Energie der Bindung ist daher höchstwahrscheinlich hauptsächlich auf die Freisetzung von Lösungsmittel zurückzuführen. Allerdings wird durch die hochaffine Bindung ($K_D = 47 \text{ nM}$) des Eglin Cs bei Komplexbildung Enthalpie freigesetzt. Demnach liegt aller Wahrscheinlichkeit nach ein Schlüssel-Schloss-Mechanismus bei der Komplexbildung vor.

Komplex TPA-E. Ähnlich wie im vorigen Komplex ist die Bindung der Eglin C-Mutante an *Triple-Phe-Ala* Trypsin Enthalpie-getrieben. Allerdings ist die Diskrepanz zwischen Enthalpie und Entropie wesentlich ausgeprägter. Der Entropiebeitrag ist nahezu vernachlässigbar ($-T\Delta S_B^0 = -5,5 \text{ kJ mol}^{-1}$). Der Grund dafür ist womöglich, dass die 175er-Schleife auch in gebundenem Zustand ungeordnet ist. Damit geht der Übergang von einem ungeordneten freien zu einem ungeordneten liganden-gebundenen Zustand mit einem Entropieverlust einher, der nur partiell durch den Entropiegewinn durch die freigesetzten Wassermoleküle kompensiert werden kann. Demnach liegt hier womöglich ein *induced-fit* oder ein *selected-fit* Mechanismus (Weikl & von Deuster, 2009; Hammes *et al.*, 2009) vor. Die Gründe für den extrem großen Enthalpiebeitrag ($\Delta H_B^0 = -35,0 \text{ kJ mol}^{-1}$) bleiben allerdings unklar.

Im Gegensatz zu den eher Enthalpie-getriebenen Komplexbildungen in den *TA-E* und *TPA-E*-Komplexen, sind die Komplexe mit Ser217Glu-Mutation, *TGA-E* und *TGPA-E*, durch einen hohen Entropiegewinn charakterisiert:

Komplex TGA-E. Beim Übergang von Eglin-freiem zu Eglin-gebundenen *Triple-Glu-Ala* wird wesentlich weniger Enthalpie ($\Delta H_B^0 = -16,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) frei als Entropie ($-T\Delta S_B^0 = -23,3 \text{ kJ mol}^{-1}$). Das ist an sich etwas verwunderlich, wenn man die Strukturen im Detail betrachtet. Im Komplex mit niedermolekularen Liganden kann die TGA-Variante verschiedene, definierte Konformationen einnehmen (*down*, *up*, *super-up*). Durch Eglin C-Bindung wird die *down*-Konformation selektiert. Wenn man sich vor Augen hält, dass sich die Komplexe *TA-E* und *TGA-E* sehr ähnlich sind, würde man erwarten, dass der Enthalpiebeitrag zur Bindung für beide Wechselwirkungen mit der Eglin C-Mutante-L45K identisch sind. Der geringere enthalpische Term in *TGA-E* könnte daher einen

Verlust an enthalpischer Wechselwirkung beim Übergang von liganden-freier *Triple-Glu-Ala* Variante zu Eglin C-gebundener Variante repräsentieren. Möglicherweise wird dies ausgelöst durch die Umordnung der intermediären Helix von der *up*-Konformation in die *down*-Konformation bei Eglin C-L45K-Bindung. Überraschend ist der relative große entropische Beitrag zur Bindung. Durch die Fixierung der Konformation durch Eglin C-Bindung und dem daraus resultierenden Verlust an Freiheitsgraden, würde man allerdings einen gegenteiligen Effekt erwarten. Da dies den beobachteten Werten scheinbar widerspricht, müssen noch andere Effekte eine Rolle spielen. Dies könnten beispielsweise Ladungsunterschiede sein, die durch die Ser217Glu-Mutation hervorgerufen werden oder der Einfluß der Freisetzung von Lösungsmittel auf die Komplexbildungsreaktion. Es könnte allerdings auch sein, dass die Annahme der Strukturgleichheit von liganden-freiem TGA und TGA in Komplex mit niedermolekularen Liganden in diesem Fall nicht richtig ist.

Komplex *TGPA-E*. Ähnlich wie beim TGA-E-Komplex verhält es sich beim *TGPA-E*-Komplex, wo auch eine leichte Bevorzugung des Entropiebeitrages ($-T\Delta S_B^0 = -20,2 \text{ kJ mol}^{-1}$) gegenüber dem Enthalpiebeitrag ($\Delta H_B^0 = -18,9 \text{ kJ mol}^{-1}$) zu sehen ist. Die *Triple-Glu-Phe-Ala* Variante liegt sowohl in Anwesenheit kleiner Liganden als auch nach Eglin C Bindung in der *up*-Konformation vor. Demnach sollte ein Gewinn oder Verlust an Freiheitsgraden und damit Entropie wiederum mehr oder weniger vernachlässigbar sein und der Großteil des Entropiegewinns bei Komplexbildung sollte aus der Freisetzung der Wassermoleküle resultieren. Allerdings könnte auch die Rotation der Phenylalaninseitenkette in Position 174 aufgrund eines sterischen Konfliktes mit Thr44 der Eglin C-Mutante (siehe Abb. 32) eine Rolle spielen. Jedoch stellt sich auch hier die Frage inwieweit Ladungsunterschiede, hervorgerufen durch die Ser217Glu-Mutation, eine Rolle spielen.

Ein weiteres in dieser Hinsicht möglicherweise interessantes Phänomen ist die im DSC beobachtete erniedrigte apparente Übergangstemperatur der beiden in den Komplexen *TGA-E* und *TGPA-E* verwendeten Trypsin-Varianten *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Glu-Phe-Ala*. Möglicherweise erniedrigt die Ser217Glu-Mutation die Stabilität der Trypsin-Varianten alleine und alle beobachteten Einflüsse auf die Komplexbildung resultieren aus dieser verminderten Stabilität des Trypsinteils der Komplexe.

Eine kurze Zusammenfassung und Übersicht der wesentlichen Ergebnisse findet sich in Tab. 15. Auch wenn die verschiedenen Trends in der Tabelle auf den ersten Blick uneinheitlich erscheinen, lassen sich einige Aussagen herauslesen und diskutieren. Eine Beobachtung ist, dass die Eglin C-Mutante-L45K, die ein sehr guter Inhibitor für die Serinprotease Trypsin ist, ein sehr schlechter Inhibitor für die homologe Serinprotease Faktor Xa ist. Entsprechend würde man erwarten, dass die Komplexdissoziationskonstante von Trypsin über die Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten bis hin zu Faktor Xa selbst zunimmt. Dies ist generell gesehen auch der Fall; allerdings brechen die beiden Trypsin-Varianten, die die Ser217Glu-Mutation enthalten, *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Glu-Phe-Ala*, den Trend etwas. Der Grund dafür ist die vielleicht aufgrund der Mutation verlorene Fähigkeit der beiden Varianten, die Wasserstoffbrückenbindung von Ser17-OG zu Gly40-O im Eglin C auszubilden. Damit einher geht eine leichte Verschiebung der Eglin C-Hauptkette bei der Komplexbildung. Im Ergebnis sollten die beiden Komplexe damit weniger stabil als erwartet sein, was so auch beobachtet wurde.

Die thermische Stabilität der eingesetzten Trypsin-Varianten lässt nicht unbedingt einen Rückschluss auf die Stabilität des gebildeten Komplexes zu. In dieser Hinsicht wäre es auch wünschenswert, Vergleichswerte für bovines Trypsin und Faktor Xa zu haben. In der Literatur konnte allerdings nur ein Wert für porcines Trypsin gefunden werden, der sicher nur eingeschränkte Vergleiche zulässt (Van Thong *et al.*, 2008). Die einzige Aussage, die sich aus der Betrachtung der Übergangstemperaturen ziehen lässt, ist die bereits diskutierte verminderte Stabilität der beiden Varianten, die die Ser217Glu-Mutation ausweisen.

Was die Qualität der NMR-Spektren betrifft, so ist es interessant zu sehen, dass nur die stabilste Trypsin-Variante *Triple-Ala* ein gut aufgelöstes NMR-Spektrum ergab, wobei selbst dies nicht von ausreichender Qualität für eine vollständige Zuordnung der Resonanzen war. Warum die anderen Varianten schlechtere Spektren ergaben ist nicht klar. Möglicherweise waren die verwendeten Pufferbedingungen oder auch die verwendete Temperatur der Datenaufnahme nicht optimal gewählt.

Auch die aus einer PISA-Analyse der Komplexe erhaltenen Δ^iG -Werte sind nur beschränkt aussagefähig. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei einer PISA-Analyse naturgemäß angenommen werden muss, dass die unkomplexierten Strukturen und die komplexierten Strukturen absolut identisch sind. Allerdings fällt auch hier auf, dass für die beiden am wenigsten stabilen Trypsin-Varianten, *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Glu-Phe-*

Ala, die auch die am wenigsten stabilen Komplexe bilden, die Δ^iG -Werte am höchsten sind. Dabei ist noch einmal hervorzuheben, dass sich die Thermodynamik der Komplexbildung beider Varianten mit der Eglin C-Mutante-L45K durch einen geringen enthalpischen und einen hohen entropischen Beitrag auszeichnet (siehe Abb. 43). Da die Δ^iG -Werte im Wesentlichen die frei werdenden Solvatationsenergien beschreiben, bestätigt dies die aus der ITC erhaltenen Ergebnisse.

Tab. 15: Kurzzusammenfassung der mittels verschiedener Methoden erhaltenen Ergebnisse.

Variante	DSC-Tm [°C]	NMR-Spektrum	Komplexbildung K_D [nM]	PISA, Δ^iG [kJ mol ⁻¹]
Trypsin	57,0 ¹⁾	-	30 ³⁾	-30,9
<i>Triple-Ala</i>	61,8	gut ²⁾	47	-38,5
<i>Triple-Glu-Ala</i>	55,6	schlecht	124	-41,8
<i>Triple-Phe-Ala</i>	59,6	schlecht	79	-34,7
<i>Triple-Glu-Phe-Ala</i>	57,9	schlecht	140	-38,1
Faktor Xa	-	-	>1000	-9,2

¹⁾ Der Wert bezieht sich auf porcines Trypsin bei pH 5.0 in Acetatpuffer (Van Thong *et al.*, 2008).

²⁾ Das Spektrum der *Triple-Ala* Variante war das qualitativmäßig beste, welches gemessen werden konnte. Dennoch war die Qualität für eine vollständige Zuordnung der Resonanzen nicht ausreichend.

³⁾ Dieser Wert wurde an inaktivem Trypsin-Ala gemessen.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass es aufgrund der Annahmen, die man machen muss, sehr schwierig ist, eine eindeutige Korrelation der ITC-Daten mit den Strukturdaten zu diskutieren. Makromolekulare Strukturen sind sehr komplex, und es ist praktisch unmöglich, alle möglichen Einflüsse zu berücksichtigen bzw. die Experimente so zu gestalten, dass etwaige Strukturunterschiede nicht ins Gewicht fallen. Allerdings läßt sich anhand der ITC/Struktur-Korrelation ein Schlüssel-Schloß Mechanismus für die Ligandenbindung von Eglin C-L45K an zwei der Varianten, nämlich an *Triple-Glu-Ala* und *Triple-Phe-Ala*, postulieren. Für die anderen beiden liegt womöglich ein *induced-fit* oder ein *selected-fit* Mechanismus (Hammes *et al.*, 2009) vor. Anhand der ITC-Daten lassen sich diese beiden Möglichkeiten nicht unterscheiden. Enzymkinetische Messungen, die diese Unterscheidung liefern könnten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Obleich es einige kombinierte thermodynamische und strukturelle Analysen über Protein-Protein-Wechselwirkungen (z.B. die Ovomuroid-Elastase-Wechselwirkung (Baker & Murphy, 1997) oder Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen gibt (Thielges *et*

al., 2008), existieren nur sehr wenige Arbeiten über die Korrelation von struktureller Plastizität und Affinität im molekularen Detail (Cooper, 1999; Murphy, 1999). Im Gegensatz dazu gibt es allerdings eine ganze Reihe von Arbeiten, die ITC- und Strukturdaten miteinander korrelieren, diese Arbeiten beziehen sich aber fast ausnahmslos auf Komplexe zwischen Proteinen und niedermolekularen Liganden (Gerlach *et al.*, 2007; Munde *et al.*, 2007; Calamini, *et al.*, 2008).

Zumindest im hier diskutierten System der Trypsin-Varianten-Eglin C-Komplexe erweist sich eine vollständige Analyse von beobachteten strukturellen Flexibilitäten in Protein-Protein-Wechselwirkungen in Hinblick auf den Einklang von Strukturinformation und Thermodynamikinformation als schwierig. Trotz verfügbarer detaillierter Strukturinformation lassen sich oftmals thermodynamische Änderungen, wie Variationen in der Freien Energie der Bindung und der Enthalpie-Entropie-Verteilung in einer Reihe von Mutanten nicht eindeutig erklären. Ähnliche Erfahrungen wurden auch in den Arbeiten an dem Chymotrypsin-Inhibitor-Subtilisin-BPN'-System (Otzen & Fersht, 1999) und dem Barnase-Barstar-System (Vaughan *et al.*, 1999) gemacht. Letzten Endes stellt sich die Frage, ob durch das Erheben weiterer thermodynamischer und struktureller Informationen tiefergehende Erkenntnisse gewonnen werden könnten. So könnte man zum Beispiel in ITC-Bindungsstudien bei verschiedenen Temperaturen die Änderung der Wärmekapazität ΔC_p des Systems bestimmen. Hätte man Strukturinformation in unkomplexierter - und komplexierter Form zur Hand, könnte man durch einen genauen Vergleich von freier und komplexierter Bindetasche den Einfluß des Lösungsmittels bei der Komplexbildung und dem damit einhergehenden Gewinn bzw. Verlust an Entropie besser abschätzen. Dennoch stellt sich die Frage, ob es bei der Komplexität der untersuchten makromolekularen Systeme jemals möglich sein wird, die im ITC beobachteten ΔH - und $T\Delta S$ -Werte mit den beobachteten Strukturänderungen eindeutig in Beziehung zu setzen. Einer der Pioniere der ITC-Methode für Makromoleküle, Prof. Alan Cooper (Glasgow) schreibt, dass die absoluten Werte für ΔH und $T\Delta S$ in einem System nur eine geringe Aussagekraft besitzen und dass selbst grosse Änderungen in diesen Werten nur eine eingeschränkte diagnostische Aussagekraft besitzen. Und es letztlich auch nur der ΔG -Wert ist, der für ein System wirklich zählt.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier Proteinkomplexe aus einer Trypsin-Variante und trypsin-spezifischem Eglin C strukturell und thermodynamisch charakterisiert. Alle vier Komplexstrukturen beruhen auf Diffraktionsdaten, die zu sehr hoher Auflösung gesammelt werden konnten und weisen sehr gute R-faktoren und geometrische Parameter nach der Verfeinerung auf.

Die beobachteten charakteristischen Unterschiede in den Ligandenbindeschleifen der Trypsin-Varianten bei Bindung der Eglin C-Mutante-L45K wurden in Beziehung gesetzt zu thermodynamischen Daten, die aus Messungen mit Isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) erhalten worden sind. Dadurch konnten die differentiellen Stabilitäten der vier untersuchten Proteinkomplexe erklärt werden.

Des Weiteren wurden auf Basis der erhaltenen Strukturen, Modelle für die Komplexe aus nativem Trypsin mit der Eglin C-Mutante-L45K und der katalytischen Domäne von Faktor Xa mit Eglin C-L45K erstellt. Diese Modelle bieten eine vereinfachte Erklärung dafür, warum die Eglin C-Mutante-L45K keine Inhibitionskompetenz für Faktor Xa aufweist.

Insgesamt ist zu sagen, dass die hier erhaltenen Ergebnisse das Verständnis der Komplexbildung von Trypsin und Trypsin-ähnlichen Varianten mit makromolekularen Inhibitoren, beispielweise Eglin C, wesentlich erweitert haben.

7 Ausblick

Während eine Röntgenstrukturanalyse ein im wesentlichen statisches Bild eines Moleküls liefert, welches nur in relativ geringem Maße auch dynamische Information enthält, ist NMR die Methode der Wahl, um die Dynamik von Biomolekülen unter nahezu physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Die Analyse der intramolekularen Dynamik der Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten durch Relaxationsmessungen steht und fällt allerdings mit einer vollständigen Zuordnung der NMR-Signale zu den einzelnen NMR-aktiven Kernen. Um dieses zu erreichen, müßten die Varianten in Lösung stabilisiert werden. Dazu bietet sich das mittels ITC und Röntgenstrukturanalyse hier bearbeitete System aus Trypsin-Varianten und dem makromolekularen Inhibitor Eglin C-L45K nahezu an. Durch Zugabe von nicht markiertem Eglin C-Ligand zu den markierten Trypsin-Varianten, könnte im Idealfall eine stabile Konformation, wie sie in den Kristallstrukturen gefunden wurde - sofern es in Lösung überhaupt eine einzige mögliche Orientierung gibt - selektiert werden. Das wiederum könnte der Ausgangspunkt für die Zuordnung aller Aminosäurereste sein und den Startpunkt für Dynamikstudien markieren.

Des Weiteren könnte in Anknüpfung an die im Rahmen der Arbeit durchgeführten thermodynamischen Untersuchungen mittels ITC, die Temperaturabhängigkeit der Komplexbildung untersucht werden. ITC-Messungen bei mindestens drei verschiedenen Temperaturen wären notwendig, um Informationen über die Wärmekapazitätsänderung, ΔC_p , zu gewinnen, womit ein weiterer Parameter zur Charakterisierung zur Verfügung stehen würde.

Auf röntgenkristallographischer Ebene ließe sich das Gesamtbild über die Faktor Xa-ähnlichen Trypsin-Varianten durch das vollständige Vorhandensein von dreidimensionalen Strukturen der Trypsin-Varianten allein erweitern. Kristallstrukturen der Trypsin-Varianten wurden hauptsächlich in Anwesenheit von nieder- bzw. makromolekularen Liganden bestimmt, jedoch nicht von Varianten im uninhibierten Zustand. Durch die Einführung der Ser195Ala-Mutation und der damit einhergehenden Inhibierung der Proteolyse der aktiven Varianten, sollte die Kristallisation aller untersuchten Varianten möglich sein, ohne dass ein externer Inhibitor zugegeben werden muss. Eine vollständige Überlagerung der Röntgenkristallstrukturen von inhibierten mit nicht-inhibierten Varianten könnte Aufschluß über die konformationelle Flexibilität der intermediären

Helix mit der 175er-Schleife liefern und die hier postulierte Komplexbildung mittels eines Schlüssel-Schloß-Prinzips bzw. eines *induced fit* Mechanismus untermauern oder widerlegen.

8 Literaturverzeichnis

- 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.
- Apostoluk, W. & Otlweski, J. (1998). Variability of the canonical loop conformations in serine proteinases inhibitors and other proteins. *Proteins* **32**, 459-474.
- Aurell, L., Friberger, P., Karlson, G. & Claesson, G. (1977). A new and highly specific chromogenic substrate for factor Xa. *Thromb. Res.* **11**, 595-609.
- Baker, B. M. & Murphy, K. P. (1997). Dissecting the energetics of a protein-protein interaction: the binding of ovomucoid third domain to elastase. *J. Mol. Biol.* **268**, 557-69.
- Barthels, M. & von Depka (2003). Das Gerinnungskompodium. *Thieme Verlag*, Stuttgart.
- Barrett, A.J., Rawlings, N.D. & Woessner Jr., F.F. (1998). Handbook of Proteolytic Enzymes, Academic Press, London and San Diego.
- Betzl, C., Dauter, Z., Genov, N., Laminz, V., Navaza, J., Schnebli, H. P., Visanji, M. & Wilson, K. S. (1993). Structure of the proteinase inhibitor eglin c with hydrolysed reactive centre at 2.0 Å resolution. *FEBS Lett.* **317**, 185-188.
- Bjelic, S. & Jelesarov, I. (2008). A survey of the year 2007 literature on applications of isothermal titration calorimetry. *J. Mol. Recognit.* **21**, 289-311.
- 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.
- Bode, W. & Schwager, P. (1975). The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *J. Mol. Biol.* **118**, 693-717.
- Bode, W., Papamokos, E., Musil, D., Seemueller, U. & Fritz, H. (1986). Refined 1.2 Å crystal structure of the complex formed between subtilisin Carlsberg and the inhibitor eglin c. Molecular structure of eglin and its detailed interaction with subtilisin. *EMBO J.* **5**, 813-8.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451.
- Bode, W. & Huber, R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 241-252.
- Brünger, A. T. (1992) Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structure. *Nature* **355**, 472-475.
- Burgering, M. J. M., Orbons, L. P. M., van der Doelen, A., Mulders, J., Theunissen, H. J. M., Grootenhuis, P. D. J., Bode, W., Huber, R. & Stubbs, M.T. (1997). The Second Kunitz Domain of Human Tissue Factor Pathway Inhibitor: Cloning, Structure Structure Determination and Interaction with Factor Xa. *J. Mol. Biol.* **269**, 395-407.

- Calamini, B., Santarsiero, B. D., Boutin, J. A. & Mesecar, A. D. (2008). Kinetic, thermodynamic and X-ray structural insights into the interaction of melatonin and analogues with quinone reductase 2. *Biochem. J.* **413**, 81-91.
- Chen, Z. & Bode, W. (1983). Refined 2.5 Å X-ray crystal structure of the complex formed by porcine kallikrein A and the bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystallization, Patterson search, structure determination, refinement, structure and comparison with its components and with the bovine trypsin-pancreatic trypsin inhibitor complex. *J. Mol. Biol.* **164**, 283-311.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Cooper, A. (1999). Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 557-563.
- Cooper, A., Nutley, M.A. & Wadood, A., Differential scanning microcalorimetry in S. E. Harding and B. Z. Chowdhry (Eds.). (2000). Protein-Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry. Oxford University Press, Oxford New York, 287-318.
- Copper, D.N., Millar, D.S., Waley, A., Pemberton, S. & Tuddenham, E.G.D. (1997). Inherited factor X deficiency: Molecular genetics and pathophysiology. *Thromb. Haemost.* **78**, 161-172.
- 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.
- Cornish-Bowden, A. (2002). Enthalpy-entropy compensation: a phantom phenomenon. *J. Biosci.* **27**, 121-126.
- Cruickshank, D. W. J. (1999). Remarks about protein structure precision. *Acta Cryst.* **D55**, 583-601. Erratum in: *Acta Cryst.* **D55**, 1108.
- Dauter, Z. (1997). Data Collection Strategies. *Methods Enzymol.* **276**, 326-344.
- Davey, M.G. & Lüscher, E.F. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* **166**, 490-506.
- Davie, E.W., Fujikawa, K. & Kisiel, W. (1991). The coagulation cascade: initiation, maintenance and regulation. *Biochem. J.* **30**, 10363-10370.
- Dolan, G., Ball, J. & Preston, F.E. (1989). Protein C and protein S. *Baillieres Clin Haematol* **2**, 999-1042.
- DSC Data Analysis in Origin-Tutorial Guide (2002), Version 7.0; Microcal, LLC, Northampton, MA, USA; pp. 89-96.
- Dullweber, F. (2000). Strukturelle und physikochemische Charakterisierung der Protein-Ligand-Wechselwirkung am Beispiel der Serinproteasen Thrombin und Trypsin. Dissertation.
- Dullweber, F., Stubbs, M.T., Musil, D., Sturzebecher, J. & Klebe, G. (2001). Factorising ligand affinity: a combined thermodynamic and crystallographic study of trypsin and thrombin inhibition. *J. Mol. Biol.* **313**, 593-614

- Dunitz, J.D. (1994) The Entropic Cost of Bound Water in Crystals and Biomolecules. *Science* **264**, 670
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* **D60**, 2126-2132.
- Engh, R. A. & Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392-400.
- Engh, R. A., Huber, R., Bode, W. & Schulze, A. J. (1995). Divining the serpin inhibition mechanism: a suicide substrate 'springe'? *TIBTECH* **13**, 503-510.
- Evans, P. R. (2005). Scaling and assessment of data quality. *Acta Cryst.* **D62**, 72-82.
- Frigerio, F., Coda, A., Pugliese, L., Lionetti, C., Menegatti, E., Amiconi, G., Schnebli, H.P., Ascenzi, P., Bolognesi, M., (1992). Crystal and molecular structure of the bovine alpha-chymotrypsin-eglin c complex at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **225**, 107-123.
- Fuentes, G., Oyarzabal, J. & Rojas, A.M. (2009). Databases of protein-protein interactions and their use in drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* **12**, 358-366.
- Furie, B. & Furie, B.C. (1988). The molecular basis of blood coagulation. *Cell* **53**, 505-518.
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, & Wilkins MR (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook. Humana Press pp 571- 607.
- Gerlach, C., Smolinski, M., Steuber, H., Sotriffer, C.A., Heine, A., Hangauer, D.G. & Klebe, G. (2007). Thermodynamic inhibition profile of a cyclopentyl and a cyclohexyl derivative towards thrombin: the same but for different reasons. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 8511-8514.
- Goddard, T.D. & Kneller, D.G. SPARKY 3, University of California, San Francisco
- Gossert, A. D., Bonjour, S., Lysek, D. A., Fioritio, F. & Wüthrich, K., (2005). Prion protein NMR structures of elk and of mouse/elk hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* **102**, 646-650.
- Grütter, M. G., Märki, W. & Walliser, H. P. (1985). Crystals of the complex between recombinant N-acetyleglin c and subtilisin. A preliminary characterization. *J. Biol. Chem.* **260**, 11436-11437.
- Grütter, M. G., Priestle, J. P., Rahuel, J., Grossenbacher, H., Bode, W., Hofsteenge, J. & Stone, S. R. (1990). Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. *EMBO J.* **9**, 2361-2365.
- Hahn, T. (ed.) (2002). International Tables for Crystallography, Volume A, 5th edition, Springer.
- Hedstrom, L., Lin, T.Y. & Fast, W. (1996). Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* **35**, 4515-4523.
- Heinz, D. W., Priestle, J. P., Rahuel, J., Wilson, K. S. & Grütter, M. G. (1990). Refined Crystal Structures of Subtilisin Novo in Complex with Wild-type and Two Mutant Eglins. Comparison with Other Serine Protease Inhibitor Complexes. *J. Mol. Biol.* **217**, 353-371.
- 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.

- Huntington, J. A., Read, R.J. & Carell, R. W. (2000). Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature* **407**, 923-926.
- Jonassen, I. & Svendsen, I. (1982). Identification of the Reactive Sites in Two Homologous Serine Proteinase Inhibitors Isolated from Barley. *Carlsberg Res. Commun.* **47**, 199-203.
- Jones, D. T. & Thornton, J. M. (1996) Potential energy functions for threading. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 210-216.
- Kabsch, W. (1976). A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Cryst.* **D32**, 922-923.
- Kabsch, W. (1993). Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J. Appl. Cryst.* **26**, 795-800.
- 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
- Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2003). Matthews coefficient probabilities: Improved estimates for unit cell contents of proteins, DNA, and protein-nucleic acid complex crystals. *Protein Sci.* **12**, 1865-1871.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2004). Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Cryst.* **D60**, 2256-2268.
- Krissinel, E. & Henrick, K. (2007). Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774-797.
- Komiyama, T., Ray, C. A., Pickup, D. J, Howard, A. D., Thornberry, N. A., Peterson, E. P. & Salvesen, G. (1994). Inhibition of interleukin-1 β converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. *J. Biol. Chem.* **269**, 19331-19337.
- Kurganov, B. I., Lyubarev, A, E, Sanchez-Ruiz, J. M. & Shnyrov, V. L. (1997). Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins. Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. *Biophys. Chem.* **69**, 125-135.
- Hammes, G. G., Chang, Y.-C. & Oas, T. G. (2009). Conformational selection or induced fit: A flux description of reaction mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 13737-13741.
- Hipler, K., Priestle, J. P., Rahuel, J. & Grütter, M. G. (1992). X-ray crystal structure of the serine proteinase inhibitor eglin c at 1.95 Å resolution. *FEBS Lett.* **309**, 139-45.
- Laskowski, M. Jr. & Qasim, M.A. (2000). What can the structures of enzyme-inhibitor complexes tell us about the structures of enzyme-substrate complexes? *Biochim. Biophys. Acta* **1477**, 324-337.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Leslie, A. G. W. (1992). Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography*, No. **26**.

- Li, L., Dantzer, J. J., Nowacki, J., O'Callaghan & Meroueh, S. O. (2008). PDBcal: A Comprehensive Dataset for Receptor-Ligand Interactions with Three-dimensional Structures and Binding Thermodynamics from Isothermal Titration Calorimetry. *Chem. Biol. Drug Des.* **71**, 529-532.
- Maier, K., Müller, H., Tesch, R., Witt, I. & Holzer, H. (1979). Amino acid sequence of yeast proteinase B inhibitor 1 comparison with inhibitor 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **91**, 1390-1398.
- Maier, K., Müller, H., Tesch, R., Trolp, R., Witt, I. & Holzer, H. (1979). Primary structure of yeast proteinase B inhibitor 2. *J. Biol. Chem.* **254**, 12555-12561.
- 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.
- Mathialagan, N. & Hansen, T. R. (1996). Pepsin-inhibitory activity of the uterine serpins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **93**, 13653-8.
- Matthews, B. W. (1968): Solvent content of protein crystals. *J.Mol.Biol* **33**, 491-497.
- McCoy, A.J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P.D., Winn, M. D., Storoni, L. C. & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J. Appl. Cryst.* **40**, 658-674.
- McPhalen, C. A., Svendsen, I., Jonassen, I. & James, M. N. G. (1985). Crystal and Molecular Structure of the Inhibitor CI-2 from Barley Seeds in Complex with Subtilisin Novo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 7242-7246.
- McPhalen, C. A. & James, M. N. G. (1987). Crystal and molecular structure of the serine proteinase inhibitor CI-2 from barley seeds. *Biochemistry* **26**, 261-269.
- Menzel, A. (2004). Expression, Faltung, Reinigung und biophysikalische Charakterisierung katalytisch inaktiver Trypsinvarianten. Diplomarbeit.
- Mueller-Dieckmann, J., Weiss, M. S. & Wilmanns, M. (2006). Protein Crystallization for X-ray. In: D. Ganten & K. Ruckpaul (eds). *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 1478-1482.
- Müller, M.M. (2003). Rationales Wirkstoffdesign und Synthese niedermolekularer Inhibitoren der Serinproteasen Faktor Xa und Urokinase-Plasminogen Aktivator. Dissertation.
- Murphey, K. P. (1999). Predicting binding energetics from structure: Looking beyond ΔG . *Med. Res. Rev.* **19**, 333-339.
- Murshudov, G.N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst.* **D53**, 240-255.
- Nar, H., Bauer, M., Schmid, A., Stassen, J. M., Wienen, W., Priepke, 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.
- 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.

- Winn, M. D., Isupov, M. N. & Murshudov, G. N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst.* **D57**, 122-133.
- Olsson, T. S., Williams, M. A., Pitt, W. R. & Ladbury, J. E. (2008). The Thermodynamics of Protein-Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. *J. Mol. Biol.* **384**, 1002-1017.
- Otlewski, J., Krowarsch, D. & Apostoluk, W. (1999). Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim. Polon.* **46**, 531-565.
- Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* **276**, 307-326.
- Otzen, D. E. & Fersht, A. R. (1999). Analysis of protein-protein interactions by mutagenesis: direct versus indirect effects. *Protein Eng.* **12**, 41-45.
- 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 2.2 Å resolution. *J.Mol.Biol.* **232**, 947-966.
- Potempa, J., Korzus, E. & Travis, J. (1994). The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* **269**, 15957-15960.
- Pellecchia, M., Sem, D. S. & Wüthrich, K. (2002). NMR in drug discovery. *Nature Reviews*, Volume 1.
- Perozzo, R., Folkers, G. & Scapozza, L. (2004). Thermodynamics of Protein-Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *J Recept Signal Transduct Res.* **24**, 1-52.
- Peterson, F. C., Gordon, N. & Gettins, P. G. W. (2001). High level bacterial expression and ¹⁵N-alanine labelling of bovine trypsin. Application to study of trypsin-inhibitor complexes and trypsinogen activation by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **40**, 6275-6283.
- Pierce, M. M., Raman, C. S. & Nall, B. T. (1999). Isothermal Titration Calorimetry of Protein-Protein Interactions. *Methods* **19**, 213-221.
- 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.
- Rauh, D., Klebe, G., Stürzebecher, J. & Stubbs, M. T. (2003). ZZ Made EZ: Influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity. *J. Mol. Biol.* **330**, 761-770.
- 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. (2003). Überführung der Faktor Xa Bindetasche in Trypsin: Ein Modellsystem für das Verständnis von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und zur Charakterisierung von Selektivitätsdeterminanten. Dissertation.
- 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.* **41**, 5445-5456.
- 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.

- Rosenberg, R. D., Edelberg, J. M. & Zhang, L. (2001): The heparin/antithrombin system: a natural anticoagulant mechanism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Clowes AW, George JN, eds. Hemostasis and thrombosis. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001: pp. 711-31.
- Rosing, J., Trans, G., Govers-Riemsma, J. W., Zwaal, R. F. & Hemker, H. C. (1980). The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* **255**, 274-83.
- Rudolph, R. & Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB* **35**, 49-55.
- Rydell, T. J., Tulinsky, A., Bode, W. & Huber, R. (1991). Refined structure of the Hirudin-thrombin complex. *J. Mol. Biol.* **221**, 583-601.
- Rydell, T. J., Yin, M., Padmanabhan, K. P., Blankenship, D. T., Cardin, A. D., Correa, P. E., Fenton II, J. W. & Tulinsky, A. (1994). Crystallographic Structure of Human γ -Thrombin. *J. Biol. Chem.* **269**, 22000-22006.
- Salwinski, L., Miller, C. S., Smith, A. J., Pettit, F. K., Bowie, J. U. & Eisenberg, D. (2004). The Database of Interacting Proteins: 2004 update. *Nucleic Acids Res.* **32**, 449-451.
- Schägger & von Jagow (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**, 368-79.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
- Schnebli, H. P. & Braun, N. J. (1986). Proteinase inhibitors as drugs, in Proteinase Inhibitors, ed. by A. J. Barrett and G. Salvesen, pp. 613-627. Elsevier, Amsterdam.
- Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H.P. & Fritz, H. (1977). Isolation and characterisation of a low molecular weight inhibitor (of chymotrypsin and human granulocytic elastase and cathepsin G) from leeches. *Hoppe Seylers Z. Physiol.Chem.* **358**, 1105-1117.
- Seemüller, U., Eulitz, M., Fritz, H. & Strobl, A. (1980). Structure of the elastase-cathepsin G inhibitor of the leech *Hirudo medicinalis*. *Hoppe Seylers Z. Physiol.Chem.* **361**, 1841-1846.
- Shotton, D. M. & Hartley, B. S. (1970). Amino-acid Sequence of Porcine Pancreatic Elastase and its Homologies with other Serine Proteases. *Nature* **225**, 802-806.
- Sichler, K., Hopfner, K. P., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W. & Brandstetter, H. (2002). The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Lett.* **530**, 220-224.
- Stanto, N. M. & Patel, S. S. (2004). T7 Lysozyme Represses T7 RNA Polymerase Transcription by Destabilizing the Open Complex during Initiation. *J. Biol. Chem.* **276**, 16136-16143.
- 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.
- 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. *Chem. Bio. Chem.* **03**, 246-249.
- 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.
- Svendsen, I., Jonassen, I., Hejgaard, J. & Boisen, S. (1980). *Carlsberg Res. Commun.* **45**, 389-395.
- Thielges, M. C., Zimmermann, J., Yu, W., Oda, M. & Romesberg, F. E. (2008). Exploring the energy landscape of antibody-antigen complexes: protein dynamics, flexibility, and molecular recognition. *Biochemistry*. **47**,7237-7247.
- Travis, J. & Salvesen, G.S. (1983). Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* **52**, 655-709.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nature Rev.*, Volume **5**.
- Tziridis, A. (2008). Untersuchungen zum Verständnis von Substrat-Liganden-Affinität mit Hilfe von *Proteinase Engineering*. Dissertation.
- Vagin, A. A., and Teplyakov, A. (1997). *MOLREP*: an Automated Program for Molecular Replacement. *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.
- Van den Berg, S., Löfdahl, P.-A., Härd, T. & Berglund, H. (2005). Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J. Biotech.* **121**, 291-298.
- Van de Locht, A., Stubbs, M. T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W. & Huber, R. (1996). The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma? *EMBO J.* **15**, 6011-6017.
- Van Thong, P., Ewing, E., Kaplan, H., Choma, C. & Hefford, M. A. (2008). Glycation Improves the Thermostability of Trypsin and Chymotrypsin. *Biotech. Bioeng.* **101**, 452-459
- Vaughan, C. K., Buckle, A. M. & Fersht, A. R. (1999). Structural response to mutation at a protein-protein interface. *J. Mol. Biol.* **286**, 1487-506.
- Weikl, T. R. & von Deuster, C. (2009). Selected-fit versus induced-fit protein binding: Kinetic differences and mutational analysis. *Proteins* **75**, 104-110.
- Whisstock, J., Skinner, R. & Lesk, A. M. (1998). An atlas of serpin conformations. *Trends Biochem.Sci.* **23**, 63-67.
- Wilmanns, M. & Weiss, M. S. (2005). Molecular Crystallography. Encyclopedia of Condensed Matter Physics (G. Bassani, G. Liedl & P. Wyder, eds.), Academic Press., pp 453-458.
- XWinNMR processing manual: XWIN-NMR processing, plotting and analysis of 1D, 2D and 3D data.(June2000,2.1Mb).

Tab. A1: Übersicht über die ausgewählten Trypsin-Variant-Strukturen mit niedermolekularen Inhibitoren.

Variante	PDB-Eintrag	Ligandnomenklatur nach IUPAC	175er-Schleife	Besonderheiten	Raumgruppe
<i>Triple</i> ¹⁾	1V2N	2,7-bis(4-amidino-benzylidene)- cycloheptan-1-on	<i>down</i>	<i>down</i>	P3 ₂ 2 ₁
		Na-(2-tosylglycyl-3-amidino-D,Lphenyl-alaninmethylester	<i>down</i>		P3 ₂ 2 ₁
		Amidinobenzol	<i>down</i>		P3 ₂ 2 ₁
<i>Triple-Glu</i> ¹⁾	1V2K	[4-(6-Chloro-naphthalen-2-sul-fonyl)- piperazin-1-yl]- ([3,4,5,6-tetra-hydro-2H-1,4']bi-pyridinyl-4-yl)-methanon	<i>up</i>	flexibel	P3 ₂ 2 ₁
	1V2L	Amidinobenzol	<i>super-up</i>		P3 ₂ 2 ₁
	1V2M	Amidinobenzol	<i>down</i>		P3 ₂ 2 ₁
<i>Triple-Phe</i> ²⁾		Amidinobenzol	keine definierte Elektronendichte	Nur im Komplex mit Benzamidin ungeordnet, in allen anderen Strukturen <i>up</i>	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
		Benzysulfonyl-D-Arginyl-Glycyl-4-Amindinobezylamid	<i>up</i>		P3 ₂ 2 ₁
		6-[1-(1-Aminoethyl)-piperidin-4-yloxy]-1-(7- carbamidoyl-naphthalin-2-ylmethyl)-2-isopropyl-2,3- dihydro-1H-indol-4-carboxylic acid	<i>up</i>		P3 ₂ 2 ₁
		N-2-[4-[(1-Acetimidoyl-4-piperidinyl)-oxy]-N'-3-(7- amidino-2-naphthylmethylene)- 2-carboxyethyl- sulfonsäureamid	<i>up</i>		C222 ₁
		3-(3-Carbamidoyl-phenyl)-isoxazol-4-carboxylsäure-(2'- sulfamoylbiphenyl-4-yl)-amid	<i>up</i>		P3 ₂ 2 ₁
<i>Triple-Glu-Phe</i> ²⁾		Amidinobenzol	<i>up</i>	<i>up</i>	P1
		Methyl-N-[(4-Methylphenyl)-Sulfonyl]-Glycyl-3- [Amidino)-methyl]-DPhenylalaninat	<i>up</i>		P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
		Benzysulfonyl-D-Arginyl-Glycyl-4-Amindinobezylamid	<i>up</i>		P3 ₂ 2 ₁
		3-(3-Carbamimi-doyl-phenyl)-isoxazol-4-car-boxylsäure- (2'-sulfamoylbiphenyl- 4-yl)-amid	<i>up</i>		P6 ₅

¹⁾ Die Kristallstrukturen stammen aus den Arbeiten von Rauh *et. al.*, (2002-2004).²⁾ Die Kristallstrukturen stammen aus der Arbeit von Tziridis, (2008).

Tab. A2: Wasserstoffbrückenbindungen in den vier untersuchten Proteinkomplexen.

			<i>TA-E</i>	<i>TA-E</i>	<i>TGA-E</i>	<i>TGA-E</i>	<i>TPA-E</i>	<i>TPA-E</i>	<i>TGPA-E</i>	<i>TGPA-E</i>
H-Brücke	Atom 1 (Eglin C)	Atom 2 (Trypsin)	Distanz [Å] AB	Distanz [Å] CD						
1	Glu 2-OE2 ¹⁾	Asp 153-N	²⁾	²⁾	²⁾	²⁾	2,85	2,85	2,73	2,79
2	Glu 2-OE2 ¹⁾	Val 154-N	²⁾	²⁾	²⁾	²⁾	3,12	3,13	2,88	2,99
3	Ser 5-N	Tyr 151-O	2,76	2,78	3,25	3,10	2,80	2,85	2,79	2,84
4	Ser 5-O	Tyr 151-N	2,80	2,84	2,70	2,89	2,83	2,81	2,87	2,89
5	Leu 7-N	Thr 149-OG1	2,82	2,90	2,77	2,89	2,82	2,78	2,79	2,81
6	Gly 40-O	Ser 217-OG	2,63	2,61	³⁾	³⁾	2,75	2,63	³⁾	³⁾
7	Pro 42-O	Tyr 99-OH	3,36	3,11	2,95	2,98	2,87	2,86	2,85	2,70
8	Val 43-N	Gly 216-O	2,84	3,07	2,81	2,97	2,94	2,92	2,94	2,88
9	Val 43-O	Gly 216-N	2,89	3,06	3,02	3,03	2,93	2,96	3,03	3,00
10	Thr 44-O	Gln 192-NE2	3,02	3,12	2,90	2,91	3,12	3,04	3,07	3,02
11	Lys 45-N	Ser 214-O	3,02	3,01	3,10	2,94	3,02	3,00	3,03	3,02
12	Lys 45-O	Gly 193-N	2,76	2,69	2,65	2,61	2,72	2,72	2,77	2,74
13	Lys 45-O	Ala 195-N	2,90	2,95	3,14	3,10	2,90	2,88	2,91	2,90
14	Lys 45-NZ	Ala 190-O	3,05	2,84	2,80	2,91	2,81	3,23	2,81	2,82
15	Leu 47-N	Phe 41-O	3,00	2,97	3,06	2,92	3,02	3,00	2,99	3,01
16	Tyr 49-N	Tyr 39-OH	3,08	3,08	2,96	3,01	3,10	3,09	3,16	3,06

¹⁾ In den Komplexen *TPA-E* und *TGPA-E* sind die OE1 and OE2 Atome von Glu 2 unterschiedlich zwischen der B und D Kette.

²⁾ In den Komplexen *TA-E* und *TGA-E* ist Glu2 nicht in der Elektronendichte definiert.

³⁾ In den Komplexen 2 und 4 ist Ser217 durch Glu ersetzt, wodurch die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke, die das OG-Atom von Ser involviert, nicht möglich ist.

Tab. A3: Salzbrücken in den vier untersuchten Proteinkomplexen.

			<i>TA-E</i>	<i>TA-E</i>	<i>TGA-E</i>	<i>TGA-E</i>	<i>TPA-E</i>	<i>TPA-E</i>	<i>TGPA-E</i>	<i>TGPA-E</i>
Salz- Brücke	Atom 1 (Eglin C)	Atom 2 (Trypsin)	Distanz [Å] AB	Distanz [Å] CD						
1	Glu 2-OE1 ¹⁾	Lys 156-NZ	²⁾	²⁾	²⁾	²⁾	2,78	2,78	2,93	2,74
2	Glu 2-OE2 ¹⁾	Lys 156-NZ	²⁾	²⁾	²⁾	²⁾	3,72	3,78	>4,0	3,77
3	Lys 45-NZ	Asp 189-OD1	3,69	3,53	3,64	3,81	3,67	3,65	3,74	3,65
4	Lys 45-NZ	Asp 189-OD2	3,44	3,16	3,33	3,35	3,29	3,23	3,24	3,24
5	Asp 46-OD1	His 57-NE2	3,84	3,87	3,91	3,98	3,95	3,84	3,99	3,95

¹⁾ In den Komplexen *TPA-E* und *TGPA-E* sind die OE1 and OE2 Atome von Glu2 unterschiedlich zwischen der B und D Kette.

²⁾ In den Komplexen *TA-E* und *TGA-E* ist Glu2 nicht in der Elektronendichte definiert.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von Prof. Dr. Milton T. Stubbs am Institut für Biochemie/Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Zeit von Januar 2005 bis Oktober 2009 angefertigt.

Mein Dank gilt:

- Prof. Dr. Milton T. Stubbs für die Möglichkeit, an dem interessanten Thema zu arbeiten, für das entgegengebrachte Vertrauen und den unerschöpflichen Optimismus,
- Dr. Daniel Rauh und Dr. Anastasia Tziridis für die Einarbeitung in das Themengebiet,
- Dr. Christian Lange für seine ständige Diskussionsbereitschaft,
- Dr. Piotr Neumann für die Hilfe bei der Datensammlung und die Einführung ins *Molecular Replacement*,
- Dr. Elizabeth Dowler und Prof. Dr. Hartmut Oschkinat vom FMP Berlin-Buch für die Durchführung der NMR-spektroskopischen Untersuchungen,
- Dr. Manfred S. Weiss vom EMBL Hamburg für die kompetente Hilfe bei der Datensammlung an der Beamline X12 (DESY Hamburg),
- Pia Rosenburg, Iljana Mögel, Kerstin Thriene und Maria Döhler für die Mitarbeit im Labor,
- allen Mitarbeitern der AG Stubbs, insbesondere Ulrike Bräuer und Anita Hoffmann, für die kollegiale Arbeitsatmosphäre und nette Zusammenarbeit,
- dem Graduiertenkolleg 1026 „*Conformational transitions in macromolecular interactions*“ und
- meiner Familie für ihre liebevolle Unterstützung.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Flexibilität und Spezifität in Protein-Protein-Wechselwirkungen am Beispiel der Komplexbildung von Trypsin-Varianten und dem Proteaseinhibitor Eglin C“

selbständig ohne erlaubte Hilfe angefertigt habe 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.

Halle im Oktober 2009

Anja Menzel

Lebenslauf

Anja Menzel

Geburtstag	24.10.1980
Geburtsort	Halberstadt
1991-1999	Gymnasium, Halberstadt
Juli 1999	Abitur, Gymnasium Martineum, Halberstadt
Okt. 1999-Sept. 2004	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Dez. 2003-Sept. 2004	Diplomarbeit mit dem Thema „ <i>Expression, Faltung, Reinigung und biophysikalische Charakterisierung katalytisch inaktiver Trypsin-Varianten</i> “ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Institut für Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg
Sept. 2004	Erteilung des akademischen Grades „Diplom-Biochemiker“
Jan. 2005-März 2007	Stipendiatin der DFG im Graduiertenkolleg 1026 „ <i>Conformational transitions in macromolecular interaction</i> “
Jan. 2005-Okt. 2009	Anfertigung der vorliegenden Dissertation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Milton T. Stubbs, Institut für Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg