Trypsin: Eine Modellprotease für die Generierung neuer Biokatalysatoren

Dissertation
zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Michael Schöpfel

geb. am 28.10.1984 in Bad Langensalza

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. M. T. Stubbs
- 2. Prof. Dr. R. Ulbrich-Hofmann
- 3. Prof. Dr. F. X. Gomis-Rüth

Tag der öffentlichen Verteidigung: 18. März 2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Proteasen	1
1.2	Klassifizierung der Proteasen	2
1.3	Regulation von Proteasen	3
1.4	Serinproteasen	4
1.4.1	Katalysemechanismus von Serinproteasen	6
1.4.2	Spezifität und Selektivität bei Serinproteasen	7
1.4.3	Aktivierung von Serinproteasen_	10
1.5	Ausgewählte Serinproteasen	12
1.5.1	Trypsin	12
1.5.2	Trypsinogen_	15
1.5.3	Enteropeptidase	17
1.6	Anwendungsmöglichkeiten von Proteasen	19
1.6.1	EK-Trypsin	22
1.6.2	Trypsiligase	26
1.7	Zielstellungen	30
1.7.1	EK-Trypsin	30
1.7.2	Trypsiligase	31
2	Materialien und Methoden	32
2.1	Materialien	32
2.1.1	Bakterienstämme	
	Plasmide	32

2.1.3	Oligonukleotide	32
	Standards und Kits	
2.1.5	Enzyme und Peptide	33
2.1.6	Nährmedien	_34
2.1.7	Chemikalien	_34
2.2	Molekularbiologische Methoden	36
2.2.1	Ortsgerichtete Mutagenese der Eglin C-Varianten	36
2.2.2	Agarosegel-Elektrophorese_	37
2.2.3	Transformation in chemisch-kompetente Zellen_	37
2.2.4	Isolierung der Plasmid-DNA	37
2.3	Genexpression und Reinigung von EK-Trypsinogen_	38
2.3.1	Genexpression von EK-Trypsinogen	38
2.3.2	Zellaufschluss und inclusion body (IB)-Isolierung von	
	EK-Trypsinogen	38
2.3.3	Renaturierung von EK-Trypsinogen	39
2.3.4	Reinigung von EK-Trypsinogen mittels Affinitätschromatographie	39
2.3.5	Reinigung von EK-Trypsin mittels Gelfiltration	40
2.4	Genexpression und Reinigung der Eglin C-Varianten, von	
	Trypsiligase und von YRH-Ecotin	41
2.4.1	Genexpression von Eglin C	41
2.4.2	Zellaufschluss von Eglin C	41
2.4.3	Reinigung von Eglin C mittels Affinitätschromatographie	41
2.4.4	Genexpression und Reinigung von r-Trypsiligase, b-Trypsiligase	
	und YRH-Ecotin_	42
2.5	Biophysikalische Charakterisierung	43
2.5.1	Bestimmung der Proteinkonzentration_	43
2.5.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
	(SDS-PAGE)	_44
2.5.3	Massenspektrometrie	45

2.6	Aktivitätsbestimmung von EK-Trypsin	45
2.6.1	Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen	45
2.6.2	Aktivitätsbestimmung mit Trypsinogen als Substrat	45
2.6.3	Aktivitätsbestimmung mit DDDDK-RNase A als Substrat	47
2.6.4	Aktivitätsbestimmung mit DDDDK-RNase S als Substrat	48
2.7	Interaktionsstudien	48
2.7.1	Gelfiltration	48
2.7.2	Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)	49
2.7.3	Analytische Ultrazentrifugation	52
2.8	Kristallisation und Röntgenkristallstrukturanalyse	54
2.8.1	Kristallisation von Proteinen	54
2.8.2	Vorbereitung, Streuung und Datensammlung der Proteinkristalle	58
2.8.3	Lösung des Phasenproblems und Strukturlösung	62
2.8.4	Manuelle Strukturanpassung und Strukturverfeinerung	65
2.8.5	Validierung, Analyse und Visualisierung der Strukturen	67
3	Ergebnisse	68
3.1	EK-Trypsinogen und EK-Trypsin	68
3.1.1	Genexpression, Rückfaltung und Reinigung von	
	EK-Trypsinogen	68
3.1.2	Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen	70
3.1.3	Aktivität von EK-Trypsin gegenüber Trypsinogen	71
3.1.4	Aktivität von EK-Trypsin gegenüber DDDDK-RNase A	74
3.1.5	Aktivität von EK-Trypsin gegenüber DDDDK-RNase S	76
3.2	Trypsiligase, Eglin C-Varianten und YRH-Ecotin	79
3.2.1	Ligandfreie Strukturen von Trypsiligase	79
3.2.1.1	b-Trypsiligase Kristallformen I und II	80

3.2.1.	.2 b-Trypsiligase Kristallform III	84
3.2.1.	.3 r-Trypsiligase Kristallform IV	95
3.2.2	2 Interaktionsstudien von Trypsiligase und Eglin C-Varianten	107
3.2.2.	.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Eglin C-Varianten	107
	2 Genexpression und Reinigung der Eglin C-Varianten	
	.3 Analyse der Interaktion von Trypsiligase und den Eglin C-Varianten	
	mittels Gelfiltration	110
3.2.2.	.4 Analyse der Interaktion von Trypsiligase und den Eglin C-Varianten	
	mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)	111
3.2.2.	.5 Analyse des Oligomerisierungszustandes von r-Trypsiligase mittels	
	analytischer Ultrazentrifugation	114
3.2.3	Struktur von b-Trypsiligase und YRH-Ecotin Kristallform V	
	,	
4	Diskussion	130
<u></u>	Diskussion	150
4.1	EK-Trypsin	130
4.2	Trypsiligase	
	11 y psinguse	
5	Zusammenfassung	156
6	Literaturverzeichnis	157
Anh	ang	
Dan	ksagung	
Lebe	enslauf	
Erkl	lärung	

Abkürzungsverzeichnis

 $\rm \mathring{A}$ Ångström, 10^{-10} m

APS Ammoniumpersulfat

AS Aminosäure

a. u. frei wählbare Einheit

bp Basenpaare

BPTI bovine pancreatic trypsin inhibitor

CD Circulardichroismus

Da Dalton

ddH₂O bidestilliertes Wasser

DNA Desoxyribonukleinsäure

DTT Dithiothreitol

ε Extinktionskoeffizient

E. coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure

ESI Elektronenstoß-Ionisierung

GdmCl Guanidiniumchlorid GSH Glutathion, reduziert

GSSG Glutathion, oxidiert

GST Glutathion-S-Transferase

HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Ibs *inclusion bodies* (Einschlusskörper)

IPTG Isopropyl-β-D-thiogalaktosid

K_D Dissoziationskonstante

LB lysogeny broth

MW molare Masse

MPD 2-Methylpentan-2,4-diol

OD₆₀₀ Optische Dichte bei 600 nm

PCR Polymerasekettenreaktion

PDB Proteindatenbank

PEG Polyethylenglycol

PMSF Phenylmethanesulfonylfluorid

PTH Parathormon

RMSD root mean square deviation

RNase A Ribonuclease A

SDS Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese

SOC super optimal catabolite repression

TAMRA Tertamethylrhodamin

TCA Trichloressigsäure
TFA Trifluoressigsäure
TEV tobacco etch virus

tPA *tissue type*-Plasminogen-Aktivator
Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

UV ultravioletter Spektralbereich

VIS Spektralbereich des sichtbaren Lichts

v/v volume per volume
w/v weight per volume
w/w weight per weight

Xaa beliebiger Aminosäurerest

Yaa beliebiger Aminosäurerest ≠ Xaa

Abkürzungen der in der Arbeit verwendeten Proteine:

EK-Trypsin S96K/N97R/T98R/L99K-Rindertrypsin (<u>Enterokinase-like Trypsin</u>) b-Trypsiligase K60E/N143H/Y151H/D189K-Rindertrypsin (*bovine*-Trypsiligase)

r-Trypsiligase K60E/N143H/E153H/D189K-Rattentrypsin (*rat*-Trypsiligase)

YRH-Ecotin M84Y/M85R/A86H-Ecotin

Aus dem Englischen übernommene Begriffe werden in *kursiver Schreibweise* dargestellt. Abkürzungen für Aminosäuren (Einbuchstabencode bzw. Dreibuchstabencode) werden gemäß der biochemischen Literatur verwendet.

1 Einleitung

1.1 Proteasen

Die Enzymgruppe der Proteinasen, die Kurzform von Peptidbindungshydrolasen, wird häufig auch als Proteasen bezeichnet. Proteasen werden unter den sechs in der Natur vorkommenden Enzymklassen den Hydrolasen zugeordnet. Sie katalysieren die hydrolytische Spaltung der Säureamidbindungen von Proteinen (Abbildung 1.1). Dabei katalysieren die Peptidasen die hydrolytische Spaltung von Peptiden, wobei man bei den Peptidasen je nachdem, wo die Hydrolyse stattfindet, zwischen Exo- und Endopeptidasen unterscheidet. Exopeptidasen spalten die Polypeptidkette von den Enden her und werden daher in Aminopeptidasen (die am N-Terminus angreifen) und Carboxypeptidasen (die am C-Terminus angreifen) unterteilt. Die Endopeptidasen hingegen hydrolysieren die Peptidbindungen innerhalb eines Peptids bzw. eines Proteins. Eine weitere Differenzierung der Proteasen findet anhand des molekularen Aufbaus des aktiven Zentrums statt. So weisen Serinproteasen (z. B. Subtilisin, Trypsin) einen Serinrest im aktiven Zentrum auf, der für die katalytische Aktivität entscheidend ist. Des Weiteren kommen in Cysteinproteasen (z. B. Papain) Cysteinreste, in Threonylproteasen (z. B. Proteasom) Threoninreste und in Aspartatproteasen (z. B. Pepsin) Aspartatreste in den aktiven Zentren vor, welche Grundlage für die proteolytische Spaltung sind (Rao et al., 1998). Bei Metalloproteasen (z. B. Thermolysin) ist der Mechanismus der Hydrolyse abhängig von einen divalenten Kation, wie z. B. einem Zn²⁺-Ion in Thermolysin (Holmes und Matthews, 1981), welches im aktiven Zentrum gebunden ist.

Abbildung 1.1: Reaktionsschema der hydrolytischen Spaltung einer Säureamidbindung.

Proteasen kommen ubiquitär in der Natur vor, so findet man z. B. im menschlichen Genom (Sequenzen für ungefähr 700 Proteasen), dass mehr als 2% der Gene für Proteasen und ihre Inhibitoren codieren (Puente *et al.*, 2005). Proteasen wirken bei Prozessen wie der Blutgerinnung, der Immunantwort und bei Entzündungsreaktionen, bei der

Proteinprozessierung, der Verdauung, in Zellsignalkaskaden sowie bei der Apoptose und der Remodelierung der extrazellulären Matrix (Puente *et al.*, 2005). So sind die Enzyme Trypsin, Chymotrypsin, Elastase oder auch Papain und Pepsin für die Spaltung von Polypeptiden im Verdauungssystem zuständig (Rothman, 1977). Proteasen wie Thrombin oder Faktor Xa wirken in der Blutgerinnung (Davie *et al.*, 1991), wohingegen C1r und verwandte Proteasen wie C1s in der Komplementkaskade hydrolytisch aktiv sind (Gros *et al.*, 2008). Tryptasen sind Proteasen in sekretorischen Granulozyten und Mastzellen, die in der Immunantwort und bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen (Pereira *et al.*, 1998). Bei Krebserkrankungen spielen Matriptasen, welche zu den membrangebundenen Proteasen gehören, und vor allem Matrixmetalloproteinasen (MMPs), insbesondere bei der Metastasierung, eine Rolle (Lin *et al.*, 1999). Auch der Kallikreinfamilie ordnet man eine Assoziation mit Krebserkrankungen zu (Diamandis *et al.*, 2000). Granzyme und Caspasen vermitteln die direkte Apoptose durch zytotoxische T-Zellen und haben somit eine Schlüsselrolle bei der Abwehr von viralen Infektionen (Barry und Bleackley, 2002).

1.2 Klassifizierung der Proteasen

Nach dem Nomenklaturausschuss der Internationalen Union der Biochemie und Molekularbiologie werden die Hydrolasen der Enzymgruppe 3 zugeordnet. Bei den Hydrolasen repräsentieren die Proteasen die Untergruppe 4, so dass nach der EC-Systematik die Nummerierung 3.4 für Proteasen codiert. Die Untergruppe der Proteasen unterteilt sich wiederum in 14 Unter-Untergruppen. Auf Grund der großen Vielfältigkeit der Reaktionen und Strukturen, die bei Proteasen bekannt sind, ist eine Klassifizierung mit dem generellen System der Enzymnomenklatur nicht einfach (Tabelle 1.1). So werden Proteasen im Moment nach drei Hauptkriterien eingeteilt: 1. nach dem Reaktionstyp der Katalyse, 2. nach der chemischen Natur des aktiven Zentrums und 3. nach den evolutionären Zusammenhang der Struktur der Protease (Rao *et al.*, 1998).

Tabelle 1.1: Klassifizierung der Proteasen (Rao et al., 1998).

Protease	Reaktion der Hydrolyse	EC-Nummer
Exopeptidasen		
Aminopeptidasen	Abspaltung einer AS vom N-Terminus	3.4.11
Dipeptidyl-Peptidasen	Abspaltung eines Dipeptids vom N-Terminus	3.4.14
Tripeptidyl-Peptidasen	Abspaltung eines Tripeptids vom N-Terminus	3.4.14

Carboxypeptidasen	Abspaltung einer AS vom C-Terminus	3.4.16 - 3.4.18
Serincarboxypeptidasen		3.4.16
Metallocarboxypeptidasen		3.4.17
Cysteincarboxypeptidasen		3.4.18
Peptidyl-Dipeptidasen	Abspaltung eines Dipeptids vom C-Terminus	3.4.15
Dipeptidasen	Spezifische Spaltung von Dipeptiden	3.4.13
Omegapeptidasen	Abspaltung zyklisierter AS	3.4.19
Endopeptidasen	Spezifische Spaltung innerhalb des Polypeptids	3.4.21 - 3.4.34
Serinproteasen		3.4.21
Cysteinproteasen		3.4.22
Aspartatproteasen		3.4.23
Metalloproteasen		3.4.24
Endopeptidasen mit unbekanntem		3.4.99
katalytischen Mechanismus		

Wie bereits oben erwähnt ist diese Einteilung nicht trivial und weist deshalb Schwächen auf. So finden sich z. B. verschiedenartige Proteasen in der gleichen Gruppe wieder bzw. werden strukturelle und evolutionäre Gemeinsamkeiten außer Acht gelassen. Ein Klassifikationsschema, MEROPS genannt (http://merops.sanger.ac.uk/), das genau diese evolutionäre Verwandtschaftsbeziehung auf Basis der Aminosäuresequenz beinhaltet, wurde 1993 von Neil D. Rawlings und Alan J. Barett etabliert und stellt eine Alternative zur EC-Systematik dar (Rawlings *et al.*, 2010; Rawlings *et al.*, 2012).

1.3 Regulation von Proteasen

Die Regulation der hydrolytischen Aktivität von Proteasen im Organismus ist dahingehend entscheidend, dass einerseits durch eine zu hohe Aktivität die Konzentration an Zielpeptiden und -proteinen herabgesetzt werden kann und sich somit negativ auf Signalkaskaden auswirken, in denen diese Proteine wirken. Andererseits muss die Aktivität so geregelt sein, dass ein akutes Signal schnell genug weitergeleitet werden kann, wie z.B. bei der Blutgerinnungskaskade. So kann die Regulation der Proteaseaktivität auf der Ebene der Transkription wie auch auf Proteinebene von statten gehen. Neben der Kofaktorabhängigkeit mancher Proteasen spielt die Zymogenaktivierung (siehe 1.4.3), bei der eine inaktive bzw. wenig aktive Vorstufe (Proprotein) durch eine proteolytische Spaltung in die aktive Protease überführt wird, eine entscheidende Rolle in der Regulation von Proteasen. Eine weitere

entscheidende Möglichkeit der Regulation bietet die Interaktion von Proteasen mit Inhibitoren, wobei man bei Proteaseinhibitoren zwischen physiologischen und synthetischen Inhibitoren unterscheiden kann.

Bei den physiologischen Inhibitoren, welche bei höheren Organismen allesamt Proteine sind, unterscheidet man nach der Art des Inhibierungsmechanismus 3 Typen: die kanonischen Inhibitoren, die nicht-kanonischen Inhibitoren sowie die Serpine (Krowarsch et al., 2003). Die kanonischen Inhibitoren besitzen einen so genannten reactive site loop, eine exponierte Bindungsschleife, die komplementär zum aktiven Zentrum der Protease ist. Der kanonische Inhibitor bindet ähnlich eines Substrates mit der exponierten Bindungsschleife an die Protease (Bode und Huber, 1992), jedoch kann der Inhibitor nicht gespalten oder die Hydrolyseprodukte nicht entlassen werden. Die nicht-kanonischen Inhibitoren hingegen interagieren durch ihren N-Terminus mit den Substratbindetaschen und dem aktivem Zentrum der Protease (Otlewski et al., 1999). Die Gruppe der Serpine (Serinprotease Inhibitoren) verhält sich ähnlich wie die kanonischen Inhibitoren. Dabei kommt es zur Spaltung einer Peptidbindung im Serpin durch die Protease, wodurch eine weit reichende konformationelle Änderung des Serpins hervorgerufen wird, was zur Inaktivierung der Protease führt. Des Weiteren sind neben der direkten Inhibierung des aktiven Zentrums von Proteasen auch allosterische Wirkweisen von Inhibitoren bekannt. So kann die Dimerisierung der Protease Caspase-9 durch die Bindung des baculoviralen Apoptoseinhibitors 3 unterdrückt und somit die Aktivität der Protease inhibiert werden (Shiozaki et al., 2003; Häcker et al., 2011).

Im Vergleich zu den proteinogenen physiologischen Inhibitoren stellen die synthetischen Proteaseinhibitoren meist niedermolekulare Verbindungen dar. Synthetische Inhibitoren können ein breites Inhibierungsspektrum zeigen und können so mehrere Proteasen einer bestimmten Klasse hemmen. Da Proteasen ein *target* für die Behandlung entsprechender Krankheiten darstellen, werden viele dieser niedermolekularen Proteaseinhibitoren in Hinblick auf *drug design* in klinischen Studien getestet (Leung *et al.*, 2000; Abbenante und Fairlie, 2005).

1.4 Serinproteasen

Da in dieser Arbeit ausschließlich mit einer speziellen Gruppe von Proteasen, den Serinproteasen, gearbeitet wurde, werden die Charakteristika dieser Gruppe detailliert beschrieben. Die Serinproteasen sind eine Gruppe von Peptidasen, der ein Drittel aller bekannten Proteasen zugeordnet wird. Der Name geht auf einen nukleophilen Serinrest im

aktiven Zentrum zurück, der für die Katalyse verantwortlich ist. Beim katalytischen Mechanismus der Serinproteasen spielen neben dem Serinrest ebenso ein Histidin- sowie ein Aspartatrest eine entscheidende Rolle.

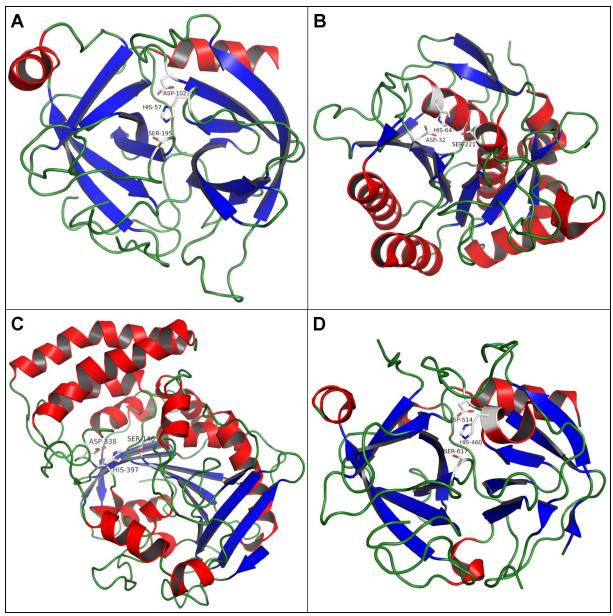


Abbildung 1.2: Die vier strukturell verschiedenen Familien der Serinproteasen mit ihren katalytischen Triaden. Cartoondarstellung (α-Helices rot, β-Stränge blau, *loops* grün) von A: Chymotrypsin mit der Stabdarstellung der Seitenketten der katalytischen Triade Asp102-His57-Ser195 (PDB-Code 1ACB, Frigerio *et al.*, 1992), B: Subtilisin mit der Stabdarstellung der Seitenketten der katalytischen Triade Asp32-His64-Ser221 (PDB-Code 1Y4A, Radisky *et al.*, 2005), C: Carboxypeptidase Y mit der Stabdarstellung der Seitenkette der katalytischen Triade Asp338-His397-Ser146 (PDB-Code 1YSC, Endrizzi *et al.*, 1994), D: Katalytische Domäne von C1s mit der Stabdarstellung der Seitenketten der katalytischen Triade Asp514-His460-Ser617 (PDB-Code 1ELV, Gaboriaud *et al.*, 2000), wobei die Seitenketten C-Atome weiß, N-Atome blau und O-Atome rot eingefärbt sind.

Die so genannte katalytische Triade (Abbildung 1.2) kann in mindestens vier strukturell verschiedenen Familien der Serinproteasen gefunden werden, was impliziert, dass sich der katalytische Mechanismus durch vier separate evolutionäre Ursprünge entwickelt hat (Dodson

und Wlodawer, 1998). Diese vier Serinproteasefamilien sind nach der MEROPS-Nomenklatur versinnbildlicht durch die Proteasen Chymotrypsin, Subtilisin, Carboxypeptidase Y und die C1p Protease (Hedstrom, 2002, Abbildung 1.2).

Unlängst wurden auch Serinproteasen mit neuen katalytischen Triaden bzw. Dyaden wie z. B. Ser-His-Glu, Ser-Lys/His, His-Ser-His oder mit N-terminalen Serinresten entdeckt (Dodson Wlodawer, 1998). Eine weitere Eigenschaft von Chymotrypsin-ähnlichen und (Trypsin-ähnlichen) Serinproteasen sind konservierte Glycinreste in der Umgebung des wobei diese Glycinreste in Form des katalytischen Serinrests, Sequenzmotifes Gly-Xaa-Ser-Yaa-Gly (Xaa und Yaa stellen zwei beliebige sich unterscheidende Aminosäuren dar) auftreten (Brenner, 1988).

1.4.1 Katalysemechanismus von Serinproteasen

Die Hydrolyse der Peptidbindung durch die Serinprotease erfolgt nach einem allgemeinen Säure-Base-Mechanismus (Abbildung 1.3). Dabei wird im ersten Schritt das entsprechende Substrat durch die Substratbindetaschen (siehe 1.4.2) gebunden. Anschließend überträgt der Serinrest der katalytischen Triade das Proton seiner Hydroxygruppe auf den Histidinrest und kann so das Kohlenstoffatom der Carbonylgruppe des Substrats nukleophil angreifen (1). Dabei werden die zwei sich nun an den Stickstoffatomen des Histidinrestes befindlichen Protonen durch Resonanzstabilität zum Aspartatrest stabilisiert. Durch den nukleophilen Angriff des Serinrestes entsteht am Carbonylkohlenstoffatom ein kovalentes, tetraedrisches Intermediat (2). Das dabei entstehende Oxyanion wird durch das so genannte Oxyanion-Loch stabilisiert. Dieses Oxyanion-Loch wird durch Aminogruppen des Polypeptidrückgrates der Protease gebildet (siehe Abbildung 1.7). Der protonierte Histidinrest fungiert nun als Säure und überträgt das Proton auf die Aminogruppe des Substrats, wodurch es zur Spaltung kommt und die Aminokomponente (C-Peptid) des Produkts entlassen wird. Dabei bildet sich am Serinrest ein Acyl-Enzym-Intermediat aus (3). Im nächsten Schritt überträgt das für die Hydrolyse benötigte Wassermolekül eines seiner Protonen auf den Histidinrest und das entstandene Hydroxidion kann das Acyl-Enzym-Intermediat nukleophil angreifen (4). zweite kovalente, tetraedrische Dadurch entsteht das Intermediat während Hydrolysereaktion (5). Anschließend wird das Proton vom Histidinrest zurück auf den wodurch die katalytische Serinrest übertragen, Triade regeneriert und die Carboxykomponente (N-Peptid) des Produkts entlassen wird (6).

Abbildung 1.3: Katalysemechanismus für Serinproteasen. Die Nummerierung des katalytischen Zentrums erfolgt nach der strukturellen Homologie zu Chymotrypsinogen (Shotton und Hartley, 1970).

1.4.2 Spezifität und Selektivität bei Serinproteasen

Da alle Proteasen Polypeptidketten als Substrate hydrolysieren, müssen verschiedene Proteasen auch zwischen verschiedenen Peptidsequenzen, d. h. Aminosäuresequenzen, unterscheiden können. Die Eigenschaft von Enzymen, zwischen Substraten zu diskriminieren und damit verbunden nur bestimmte Substrate umzusetzen, nennt man Spezifität. Dabei können Enzyme eine strikte Spezifität gegenüber nur einem Substrat besitzen oder aber spezifisch gegenüber eine bestimmte Art von chemischer Reaktion oder funktioneller Gruppe sein. Für die Bildung des Substrat-Enzym-Komlexes ist die Bindung des Substrats im aktiven Zentrum nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip von entscheidender Bedeutung. Die Spezifität eines Enzyms ist somit durch die strukturelle dreidimensionale Anordnung der Aminosäureseitenketten und des Polypeptidrückgrates des Enzyms vorgegeben.

Bei Proteasen wird die Substratspezifität nach dem Schema von Schechter und Berger beschrieben (Schechter und Berger, 1967). Diese Nomenklatur, welche die Wechselwirkung

zwischen den Proteasen und ihren Substraten verdeutlicht, ist in Abbildung 1.4 dargestellt. Dabei werden die Aminosäurereste im Peptidsubstrat mit P und die komplementären Substratbindetaschen der Protease mit S bezeichnet. Ausgehend von der Peptidbindung, die durch die Protease gespalten wird, werden die N-terminal davon liegenden Aminosäurereste des Substrats mit P1, P2, P3 usw. und die entsprechenden Bindetaschen der Protease mit S1, S2, S3 usw. nummeriert. Dahingehend werden die C-terminal von der zu spaltenden Peptidbindung liegenden Aminosäurereste des Substrats mit P1', P2', P3' usw., die korrespondierenden Substratbindetaschen der Protease mit S1', S2', S3' usw. bezeichnet.

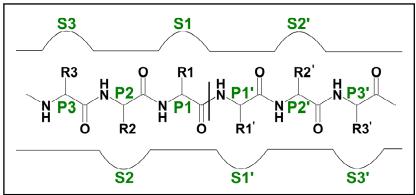


Abbildung 1.4: Nomenklatur der Substratbindetaschen sowie der Aminosäurereste nach Schechter und Berger (1967). Die zu spaltende Säureamidbindung ist durch | dargestellt. Die Aminosäurereste des Substrats sind mit P, die Substratbindetaschen der Protease mit S gekennzeichnet. Der Zusatz ' wird für die C-terminal von der zu spaltenden Peptidbindung befindlichen Aminosäurereste des Substrats und Bindetaschen verwendet.

Die Spezifität von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen wird hauptsächlich auf die Interaktion zwischen P1/S1 zurückgeführt. Chymotrypsin z. B. bind*et al*s P1-Rest in seiner S1-Bindetasche große hydrophobe und aromatische Aminosäurereste. So wird die Aminosäure Phe im Vergleich zu Ala von Chymotrypsin um den Faktor 50000 bevorzugt (Knowles, 1965; Dorovska *et al.*, 1972). Die Protease Trypsin bindet hingegen die basischen Aminosäurereste Lys und Arg in der S1-Bindetasche und Elastase bevorzugt kleine aliphatische P1-Reste. Diese Diskriminierung zwischen den Aminosäureresten in der P1-Position wird, wie bereits oben erwähnt, durch den Aufbau der S1-Bindetasche der Protease bestimmt. Die S1-Bindetasche von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen wird durch die Reste 189 - 192, 214 - 216 und 224 - 228 gebildet (siehe Anhang A.1). Dabei wird die Spezifität der S1-Bindetasche vor allem durch die Reste 189, 216 und 226 bestimmt (Perona und Craik, 1995; Czapinska und Otlewski, 1999).

Die Kombination von Ser189, Gly216 und Gly226 bildet in Chymotrypsin eine tiefe hydrophobe Tasche (Abbildung 1.5 A), was die Spezifität gegenüber großen hydrophoben und aromatischen Aminosäureresten erklärt (Blow, 1971). In Trypsin wird durch das Asp189 eine negativ geladene S1-Bindetasche gebildet (Abbildung 1.5 B), wodurch die Spezifität für

Substrate mit Lys- oder Arg-Resten in P1-Position zustande kommt (Huber *et al.*, 1974; Krieger *et al.*, 1974). Die Aminosäuren 216 und 226 sind in Trypsin ebenfalls Glycinreste, weshalb ebenso große Aminosäurereste, wie eben Lys oder Arg, begünstig sind. Die S1-Bindetasche von Elastase ist durch die Aminosäurereste Ser189, Val216 und Thr226 charakterisiert (Abbildung 1.5 C). Durch diese Kombination ist die S1-Bindetasche von Elastase im Vergleich zu Chymotrypsin und Trypsin kleiner und somit können nur kleine aliphatische Aminosäuren als P1-Rest gebunden werden (Shotton und Watson, 1970).

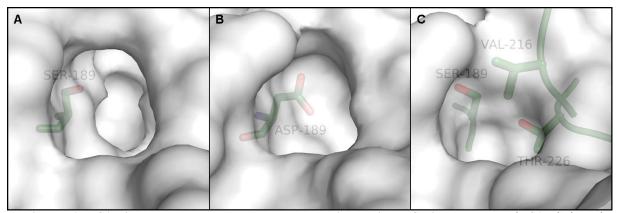


Abbildung 1.5: S1-Bindetaschen von ausgewählten Trypsin-ähnlichen Serinproteasen. Die S1-Bindetasche von A: Chymotrypsin, welche große hydrophobe bzw. aromatische Seitenketten bevorzugt (PDB-Code 2GCH, Cohen *et al.*, 1981), B: Trypsin, welche basische Seitenketten bevorzugt (PDB-Code 3MFJ, nicht publiziert von Brzuszkiewicz *et al.* mit einer Auflösung von 0,8 Å), C: Elastase, welche kleine hydrophobe Seitenketten bevorzugt (PDB-Code 1LVY, Schiltz *et al.*, 1997). Oberflächendarstellung der Gesamtstruktur in weiß und Stabdarstellung wichtiger Seitenketten (C-Atome grün, O-Atome rot).

Die S2 - S3-Bindetaschen spielen in manchen Serinproteasen, wie z. B. in Chymotrypsin, eine geringe Rolle in der Diskriminierung von Substraten und stehen so in Einklang mit der Funktion als Verdauungsprotease (Schellenberger *et al.*, 1991). Bei anderen Serinproteasen hingegen können diese Bindetaschen entscheidende Faktoren für die Substraterkennung sein. So stellt die P3/S3-Wechselwirkung in Elastase einen Hauptfaktor für die Spezifität dar (Stein *et al.*, 1987; Bode *et al.*, 1989). Die Erkennungssequenz -DDDDK- stellt bei der hydrolytischen Spaltung durch Enteropeptidase die P5 - P1-Reste des Substrats dar und interagieren vor allem mit den S4-, S2- und S1-Bindetaschen der Protease (Lu *et al.*, 1999). Die S1' - Sn'-Bindetaschen können ebenso für die Diskriminierung von Aminosäureresten an den entsprechenden P1' - Pn'-Positionen und damit verbunden zur Spezifität der Serinprotease beitragen. Chymotrypsin z. B. bevorzugt als P1'-Rest ein Lys oder Arg, was auf elektrostatische Wechselwirkungen zum Asp35 und Asp64 der S1'-Bindetasche zurückgeführt werden kann (Schellenberger *et al.*, 1994).

1.4.3 Aktivierung von Serinproteasen

Wie bereits erwähnt (siehe 1.3) werden viele Proteasen als inaktive Vorstufe, "Zymogen" genannt, produziert. Das Zymogen wird durch limitierte Proteolyse in die aktive Konformation überführt, sie dient so der Regulation von Proteasen. Die Zymogenaktivierung spielt somit eine zentrale Rolle in wichtigen biologischen Prozessen (Neurath, 1989). Ein weiterer Vorteil der Zymogene ist, dass die Aktivität der Protease durch die limitierte Proteolyse erst an den Orten entsteht, an denen die Protease wirkt. So konnte gezeigt werden, dass frischer Pankreasextrakt, der für die Bildung von Verdauungsenzymen verantwortlich ist, proteolytisch inaktiv ist (Petry, 1912). Verdauungsproteasen wie z. B. Trypsin werden im Pankreas als Zymogen, in dem Fall Trypsinogen, hergestellt und anschließend in den Zwölffingerdarm sezerniert. Dort werden sie z. B. durch Enteropeptidase (siehe 1.5.3) proteolytisch aktiviert und können ihre Katalyse durchführen.

Die Zymogene der Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen wie z. B. Chymotrypsinogen (Freer *et al.*, 1970; Wang *et al.*, 1985) und die der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen wie z. B. Prosubtilisin (Gallagher *et al.*, 1995) sind dabei die bekanntesten. Jedoch sind ebenso Zymogene aus anderen Proteasefamilien wie Procathepsin B (Cysteinprotease), Pepsinogen (Aspartatprotease) oder Prostromelysin (Metalloprotease) und deren strukturelle Analyse Gegenstand der Wissenschaft.

Bei den Mitgliedern der Chymotrypsin-ähnlichen (Trypsin-ähnlichen) Serinproteasen aus Säugetieren ist dabei ein unverwechselbaren Aktivierungsmechanismus konserviert (Huber und Bode, 1978), wohingegen die bakteriellen Homologen einen alternativen Mechanismus der Zymogenaktivierung besitzen (Brayer *et al.*, 1979). Das Aktivierungspeptid (siehe Anhang A.1) der Chymotrypsin-ähnlichen bzw. Trypsin-ähnlichen Säugetier-Serinproteasen wird proteolytisch abgespalten und der Aminosäurerest Ile16 wird zum neuen N-Terminus (Abbildung 1.6). Die neue α-Aminogruppe von Ile16, welches in dieser Enzymfamilie konserviert vorliegt, bildet nun eine für Solvensmoleküle unzugängliche Salzbrücke mit der γ-Carboxygruppe von Asp194. Die Bildung dieser "begrabenen Salzbrücke" geht mit einer konformationellen Änderung des Asp194 im Vergleich zur Zymogenstruktur einher, was zur Umorientierung der umgebenden Reste und damit zur Bildung des Oxyanion-Lochs, der katalytischen Triade und der S1-Bindetasche in der aktiven Protease führt (Abbildung 1.6) (Freer *et al.*, 1970; Bode *et al.*, 1976; Fehlhammer *et al.*, 1977; Huber und Bode, 1978).

Abbildung 1.6: Aktivierung von Trypsinogen modifiziert aus Stubbs et al. (1998). Die katalytische Triade ist bereits im Trypsinogen ausgebildet, wohingegen das Peptidrückgrat der Reste Gly193 - Ser195 in der inaktiven Konformation vorliegt und Asp194 mit der Zymogentriade (Ser32-His40-Asp194) wechselwirkt. Die Spaltung der Arg15-Ile16 Peptidbindung führt zur Insertion von Ile16 in dessen Aktivierungstasche und zur Bildung der begrabenen Salzbrücke mit Asp194. Das Resultat dieser Salzbrücke ist die Umordnung der Aktivierungsdomäne, welche gleichzeitig mit der Ausbildung der S1-Bindetasche und des Oxyanion-Loches (Gly193 - Ser195) einhergeht. Die Nummerierung erfolgte nach Chymotrypsinogen (Shotton und Hartley, 1970).

Zymogene können eine eigenständige Aktivierungsdomäne besitzen, die während der proteolytischen Spaltung am N-Terminus in die aktive Konformation überführt wird. In Chymotrypsin und Trypsin besteht die Aktivierungsdomäne aus vier Segmenten: vom N-Terminus bis zum Aminosäurerest 19 sowie die Aminosäurereste 142 - 152, 184 - 193 bzw. 216 - 223 (Huber und Bode, 1978) Diese vier Segmente unterscheiden sich zwischen dem inaktiven Zymogen und der aktiven Protease strukturell von einander (siehe 1.5.1 und 1.5.2). Die Aktivitätsunterschiede zwischen dem Zymogen und der aktiven Protease können in der Familie der Serinproteasen weit variieren. So unterscheiden sich Trypsinogen und Trypsin in ihrer Aktivität um den Faktor 10⁷ (Bode, 1979), wobei das Trypsinogen somit ein Zymogen mit hoher "Zymogenität" darstellt. Auf der anderen Seite unterscheidet sich die Aktivität von single-chain tPA (tissue type-Plasminogen-Aktivator), was die Zymogenform darstellt, zu two-chain tPA (aktive Protease) nur um den Faktor 5 - 10 (Ranby et al., 1982; Tate et al., 1987). Wenn sich die Aktivität nur um einen so geringen Faktor unterscheidet, spricht man von einer niedrigen "Zymogenität" der Protease.

Die Unterschiede in der Zymogenität kann durch verschiedene Faktoren verursacht werden. Ein Aspekt ist das Vorhandensein einer "Zymogentriade" wie z.B. in Chymotrypsinogen oder Trypsinogen, die aus den Aminosäureresten Ser32-His40-Asp194 besteht. Die Zymogentriade stabilisiert Asp194 und damit verbunden die Aktivierungsdomäne in ihrer

nichtfunktionellen Konformation (Abbildung 1.6) (Bode, 1979; Madison *et al.*, 1993). Dieser Faktor, der den zymogenen Zustand stabilisiert, ist in tPA und vielen anderen Serinproteasen nicht vorhanden. Bei anderen Zymogenen wie dem des tPAs können interne Aminosäurereste, wie in diesem Fall das Lys156, mit der Aminogruppe seiner Seitenkette in die Aktivierungstasche des Ile16 inserieren. Dadurch wird ohne Zymogenaktivierung durch eine partielle Salzbrücke zwischen Lys156 und Asp194 der aktive Zustand der Protease generiert (Renatus *et al.*, 1997).

Eine weitere Erklärung für die mehr oder weniger großen Aktivitätsunterschiede kann das Vorhandensein eines allosterischen Gleichgewichts zwischen der inaktiven und der aktiven Proteaseform sein. So zeigt der aktivierte Blutgerinnungsfaktor VIIa, welcher im Blut zirkuliert, nur eine schwache Proteaseaktivität. Erst wenn das Gewebethromboplastin ins Blut sekretiert wird, interagiert Faktor VIIa mit diesem und entfaltet seine volle katalytische Aktivität (Banner et al., 1996; Eigenbrot et al., 2001). Ebenso zeigt der Komplementfaktor D eine inaktive Konformation mit einer deformierten katalytischen Triade bis zur Wechselwirkung mit C3b und Faktor B, die die Substratbindung und die katalytische Aktivität begünstigen (Jing et al., 1999; Narayana et al., 1994; Forneris et al., 2010; Jing et al., 1998). Somit stehen die hoch aktiven Proteasen Trypsin, C1r und Thrombin im Kontrast zu den weiterhin in zymogenähnlicher Form vorliegenden Komplementfaktor D oder Blutgerinnungsfaktor VIIa. Diese Erkenntnis führt zu der Annahme, dass nach der Überführung vom Zymogen zur aktiven Protease neben der aktiven auch die inaktive Konformation auftreten kann.

1.5 Ausgewählte Serinproteasen

1.5.1 Trypsin

Die Serinprotease Trypsin (EC: 3.4.21.4, MEROPS: S01.127), erstmals im Jahre 1876 von Kühne beschrieben (Gutfreund, 1976), stellt die aktive Form von Trypsinogen (1.5.2) dar und wird in die Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen eingeordnet. Für Trypsin, das in der Natur z. B. in Säugetieren, Insekten, Fischen und Pilzen vorkommt (Hedstrom, 2002), sind verschiedene Isoformen bekannt. So kommt z. B. im Menschen neben dem kationischen Trypsin (ca. 66%) und dem anionischen Trypsin (ca. 33%) auch das Mesotrypsin (ca. 1%) vor. Dabei wird, wie bereits erwähnt, Trypsin als zymogene Vorstufe im Pankreas produziert und in den Zwölffingerdarm sezerniert, wo es durch Enteropeptidase (1.5.3) aktiviert wird. Im

Duodenum kann Trypsin wiederum andere zymogene Vorstufen von Verdauungsenzymen, wie z. B. Chymotrypsinogen und Proelastase oder auch Procarboxypeptidase A (Wade *et al.*, 1988), proteolytisch spalten und somit aktivieren.

Da Trypsin natürlicherweise im Duodenum aktiv ist, liegt sein pH-Optimum zwischen 7 - 8. Aufgrund der Protonierung von His57 und Asp102 im sauren pH-Bereich können diese, wie im Katalysemechanismus (1.4.1) notwendig, nicht mehr als Basen fungieren und Trypsin verliert somit seine Aktivität mit abnehmenden pH-Wert. Bei basischen pH-Werten über 10 verliert Trypsin aufgrund der Deprotonierung des N-Terminus und dem damit verbundenen Auseinanderreißen der Salzbrücke zwischen Ile16 - Asp194, wodurch das konformationelle Gleichgewicht auf die Seite der zymogenähnlichen Konformation verlagert wird (Hess et al., 1970; Fersht, 1972), ebenso seine proteolytische Aktivität. Die Aktivität von Trypsin steigt durch Zugabe von geringen Konzentrationen (10 - 20 mM) Ca²⁺-Ionen (Corey und Craik, 1992), wobei die Ca²⁺-Ionen nicht für die Katalyse benötigt werden, sondern die Protease stabilisieren. Aus diesem Grund findet man in der Trypsinstruktur eine Calcium-Bindestelle, der weit vom aktiven Zentrum entfernt lokalisiert ist. Das Ca²⁺-Ion wird dabei von sechs Liganden komplexiert, welche dabei die Ecken eines Oktaeders einnehmen (Bode und Schwager, 1975). Diese sechs Liganden sind jeweils eines der ε-Sauerstoffatome von Glu70 und Glu80, die Carbonylsauerstoffatome der Aminosäurereste 72 und 75 (Asn72 und Val75 im kationischen Rindertrypsin) und zwei Wassermoleküle (Abbildung 1.7).

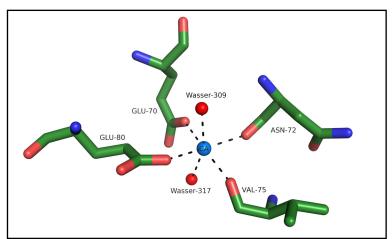


Abbildung 1.7: Calcium-Bindestelle in Rindertrypsin (PDB-Code 3MFJ). Das Ca²⁺-Ion (blaue Kugel) wird dabei von den sechs Liganden, welche die Aminosäurereste Glu70, Asn72, Val75 und Glu80 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) sowie zwei Wassermoleküle (in 3MFJ Wasser 309 und 317, rote Kugeln) sind, koordinativ gebunden.

Wie unter 1.4.2 bereits beschrieben hydrolysiert Trypsin Peptidbindungen nach den basischen Aminosäurereste Lysin und Arginin, die den entsprechenden P1-Rest des Substrats darstellen. Bei diesen zwei basischen Aminosäureresten wird die Amidhydrolyse nach Arginin im

Vergleich zu Lysin um den Faktor 7 bevorzugt. Die Erkennung von Arginin wird direkt über die elektrostatische Interaktion dessen Guanidinogruppe mit der γ-Carboxygruppe des Asp189 der S1-Bindetasche vermittelt (Perona *et al.*, 1993). Dagegen ist die Wechselwirkung bei der Erkennung von Lysinresten durch ein Wassermolekül vermittelt, welches mit der ζ-Aminogruppe vom Lysin und der γ-Carboxygruppe von Asp189 interagiert (Rühlmann *et al.*, 1973). Dabei wird die S1-Bindetasche, welche den basischen P1-Rest des Substrats erkennt, neben dem Asp189 von den Aminosäureresten 189 - 192, 214 - 216 und 224 - 228 gebildet (Hedstrom, 2002). Die katalytische Triade, welche für die Proteolyse verantwortlich ist, wird in Trypsin durch die für Chymotrypsin-ähnliche (Trypsin-ähnliche) Serinproteasen charakteristischen Aminosäuren Asp102-His57-Ser195 gebildet. Das Oxyanion-Loch, das das negativ geladene Oxyanion im Übergangszustand stabilisiert (siehe Abbildung 1.3), wird durch die Amidstickstoffatome von Gly193 und Ser195 geformt.

Die Isoformen von Säugetier-Trypsinen besitzen eine molare Masse von ca. 24 kDa. Dabei können sich die Isoformen hinsichtlich ihrer Sequenz sehr voneinander unterscheiden. So beträgt die Sequenzidentität von kationischem und anionischem Rattentrypsin z. B. 77% und die zwischen kationischem Ratten- und Rindertrypsin 78% (http://www.uniprot.org/blast/). Die Bezeichnungen "kationisch" und "anionisch" leiten sich von der Nettoladung des jeweiligen Trypsins, hervorgerufen durch die positiv und negativ geladenen Aminosäurereste, her. Beispielsweise unterscheidet sich das oben genannte kationische Rattentrypsin vom anionischen Rattentrypsin um eine Nettoladung von 11 (kationisches Rindertrypsin und anionisches Rindertrypsin haben einen Unterschied von 14 in der Nettoladung), wobei der Unterschied der Nettoladung in der Aktivierungsdomäne allein vier beträgt (Pasternak *et al.*, 1999). Aufgrund dieser Unterschiede in der Sequenz können sich die Isoformen in ihren Aktivitätsoptima wie auch hinsichtlich der Flexibilität der Aktivierungsdomäne voneinander unterscheiden (Soman *et al.*, 1989; Pasternak *et al.*, 1999).

Alle bekannten Isoformen von Trypsin zeigen unabhängig von den Unterschieden in der Sequenz identische, für Trypsin-ähnliche Serinproteasen typische Tertiärstrukturen. Dabei zeigt sich eine für den Chymotrypsin- bzw. Trypsin-*fold* typische zwei β-*barrel* Domänen-Struktur mit dem dazwischen befindlichen aktiven Zentrum mit der katalytischen Triade (Abbildung 1.8). Weiterhin weist die Tertiärstruktur von Trypsin zwei α-Helices, eine intermediäre und eine lange C-terminale, auf. Diese Tertiärstruktur wird durch die sechs konservierten Disulfidbrücken Cys22-Cys157, Cys42-Cys58, Cys128-Cys232, Cys136-Cys201, Cys168-Cys182 und Cys191-Cys220 stabilisiert. Die für die Aktivität entscheidende "begrabene Salzbrücke" zwischen Ile16 und Asp194 und die damit verbundene

Fixierung des N-Terminus ist in der Trypsinstruktur ebenso sichtbar wie die damit verbundene starre Konformation der Aktivierungsdomäne (Abbildung 1.8). Die Nummerierung der Aminosäurereste in Trypsin orientiert sich an der Aminosäureabfolge des homologen Proteins Chymotrypsinogen (Shotton und Hartley, 1970).

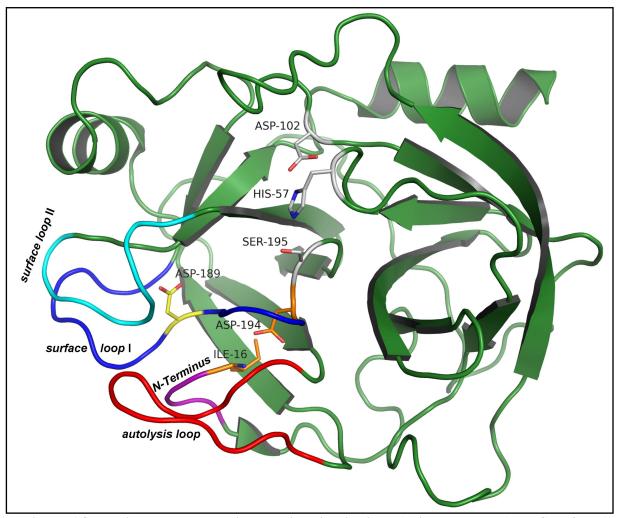


Abbildung 1.8: Tertiärstruktur von Rindertypsin mit wichtigen Aminosäurereste (PDB-Code 3MFJ). Cartoondarstellung von Rindertrypsin (grün), wobei die Segmente der Aktivierungsdomäne, das N-terminale Segment (AS 16 - 19, lila), der *autolysis loop* (AS 142 - 152, rot), der *surface loop* I (AS 184 - 193, blau) und der *surface loop* II (AS 216 - 223, cyan) farblich hervorgehoben sind. Die Seitenketten der wichtigsten Aminosäurereste: die katalytische Triade Asp102-His57-Ser195 (C-Atome weiß, N-Atome blau, O-Atome rot), die Salzbrücke aus Ile16-Asp194 (C-Atome orange, N-Atome blau, O-Atome rot) sowie das sich am Boden der S1-Bindetasche befindende Asp189 (C-Atome gelb, O-Atome rot), sind in Stabdarstellung gezeigt.

1.5.2 Trypsinogen

Wie bereits beschrieben ist Trypsinogen die zymogene Vorstufe von Trypsin, das durch Enteropeptidase proteolytisch gespalten wird. Dabei wird das Aktivierungspeptid, auch Propeptid genannt, Val-Asp-Asp-Asp-Lys (siehe Anhang A.1) durch Enteropeptidase abgespalten und die Aktivierungsdomäne erfährt seine konformationelle Änderung wie bereits

unter 1.4.3 beschrieben. In Trypsinogen ist die Aktivierungsdomäne durch vier Segmente gekennzeichnet: N-Terminus bis Gly19, Gly142 - Pro152 (autolysis loop), Gly184 - Gly193 (surface loop I) und Gly216 - Asn223 (surface loop II) (Abbildung 1.8 und Abbildung 1.9 A), welche durch die Aktivierung eine Umorientierung erfahren (Huber und Bode, 1978). Dabei sind 5 der 7 Aminosäurereste, mit denen die Regionen der Aktivierungsdomäne beginnen oder enden, Glycinreste. Die Glycinreste sind verantwortlich für die Flexibilität und Verformbarkeit der Aktivierungsdomäne, da sie im Vergleich zu anderen Aminosäureresten durch die fehlende Seitenkette weniger sterisch fixiert sind.

Hinsichtlich der Aktivität besitzt Trypsinogen eine hohe Zymogenität, also einen großen Aktivitätsunterschied zu Trypsin (siehe 1.4.3). Dabei ist kationisches Rindertrypsinogen um den Faktor 10⁻⁷ und anionisches Rattentrypsinogen um den Faktor 10⁻⁸ weniger aktiv als das entsprechende Trypsin (Bode, 1979; Pasternak *et al.*, 1999).

Die strukturellen Analysen von Trypsinogen zeigen, dass die Aktivierungsdomäne nicht starr, sondern flexibel ist. So ist in der Kristallstrukturanalyse für die entsprechenden Aminosäurereste keine Elektronendichte sichtbar, was für eine hohe Flexibilität dieser Regionen spricht (Fehlhammer *et al.*, 1977; Walter *et al.*, 1982). Des Weiteren konnte die Flexibilität bzw. die verschiedensartige Konformation der Aktivierungsdomäne in Lösung mittels Fluoreszenz- und CD-Messungen für Rattentrypsinogen und Rattentrypsin nachgewiesen werden. So konnte gezeigt werden, dass 15% der Gesamtstruktur im Trypsinogen ungeordnet sind (Pasternak *et al.*, 1999).

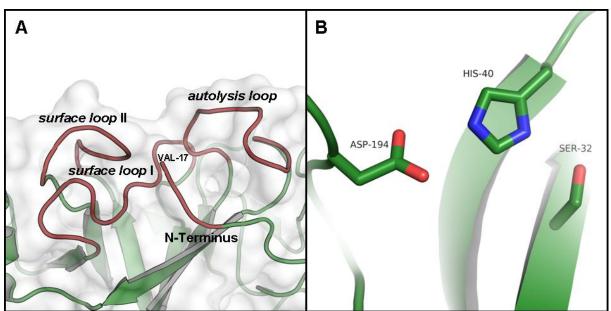


Abbildung 1.9: Zymogeneigenschaften von Trypsinogen. A: Cartoondarstellung der vier Segmente der Aktivierungsdomäne in rot, restliches Trypsinogen in grün (PDB-Code 2TGD, nicht publiziert von Jones und Stroud) zusätzlich ist die Oberfläche von Trypsinogen mit einer Transparenz von 0,8 in weiß gezeigt. B: Stabdarstellung der Seitenketten der Zymogentriade Ser32-His40-Asp194 (C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot, PDB-Code 1TGB, Fehlhammer *et al.*, 1977).

Neben der Flexibilität der Aktivierungsdomäne kann in den strukturellen Untersuchungen ebenso die Zymogentriade (Ser32-His40-Asp194) beobachtet werden (Abbildung 1.9 B). Dabei befindet sich Asp194 mit seiner γ-Carboxygruppe in Wechselwirkung zum His40, welches wiederum mit Ser32 interagiert. Diese Interaktion wird durch die Umorientierung des Ile16 nach der proteolytischen Spaltung des Zymogens und damit verbunden mit der Ausbildung der begrabenen Salzbrücke zum Asp194 aufgelöst (Abbildung 1.8).

Der Aktivierungsdomäne von Trypsinogen können ebenso allosterische Eigenschaften zugeordnet werden (1.4.3), wobei die Segmente der Aktivierungsdomäne durch Substrate oder Inhibitoren in die aktive oder aktivähnliche Konformation von Trypsin überführt werden können (Bode *et al.*, 1978; Bolognesi *et al.*, 1982; Perona *et al.*, 1994). So zeigen die Segmente der Aktivierungsdomäne der Struktur mit dem PDB-Code 2TGD (Abbildung 1.9 A) eine Zwischenstufe der Trypsinogen- und der Trypsin-Konformation. Dabei wurde das Trypsinogen mit dem Inhibitor Diisopropylphosphonat kristallisiert, welcher kovalent an das im aktiven Zentrum befindliche Ser195 gebunden ist und dafür sorgt, dass die Aktivierungsdomäne eine starre Konformation einnimmt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung von Rattentrypsinogen mit bovine pancreatic trypsin inhibitor (BPTI) sowohl die surface loops wie auch das Ile16 eine Konformation einnehmen, die Trypsin-ähnlich ist (Pasternak et al., 1999). Diese Umorientierung geschieht, obwohl das Ile16 durch seine Peptidbindung zum Lys15 keine freie Aminogruppe besitzt und somit keine "begrabene Salzbrücke" zum Asp194 ausbilden kann. Somit kann Trypsinogen zu einer Gruppe von vielen regulierten Proteinen eingeordnet werden, die in Abwesenheit ihrer Effektormoleküle teilweise ungeordnet vorliegen.

1.5.3 Enteropeptidase

Die Enteropeptidase (EC 3.4.21.9, MEROPS: S01.156), früher auch Enterokinase genannt, ist eine Serinprotease, die das N-terminale Aktivierungspeptid von Trypsinogen proteolytisch abspaltet, so dass Trypsin frei gesetzt wird (Yamashina, 1956; Imamura und Kitamoto, 2003). Säugetierenteropeptidasen sind dabei mit der Bürstensaummembran des Zwölffingerdarms assoziiert. In seiner zymogenen Form besteht die Rinderenteropeptidase aus einer Polypeptidkette mit einer molaren Masse von 115 kDa. Das Enteropeptidasezymogen wird durch Duodenase zwischen Lys800 und Ile801 proteolytisch gespalten, wodurch eine N-terminale schwere Kette und eine C-terminale leichte Kette entstehen (Zamolodchikova *et al.*, 2000). Diese zwei Ketten sind durch eine Disulfidbrücke kovalent verbunden. Die

schwere Kette des Proteins ist in der Zellmembran verankert und erhöht die Spezifität von Enteropeptidase gegenüber Trypsinogen (Lu *et al.*, 1997). Die leichte Kette der Enteropeptidase hingegen besitzt den für Trypsin-ähnliche Serinproteasen typischen Faltungstyp mit der zwei β-*barrel* Domänen-Struktur (Abbildung 1.10 A).

Es konnte gezeigt werden, dass die leichte Kette nach der Separierung von der schweren Kette (Light und Fonseca, 1984) oder nach heterologer Expression (Collins-Racie *et al.*, 1995; Vozza *et al.*, 1996) seine Aktivität und seine Substratspezifität beibehält. Da die leichte Kette der Enteropeptidase (siehe Anhang A.1) separat die gleiche Aktivität und Spezifität wie in Verbindung mit der schweren Kette zeigt und da in dieser Dissertation ausschließlich mit der leichten Kette gearbeitet wurde, wird diese im folgendem als Enteropeptidase bezeichnet.

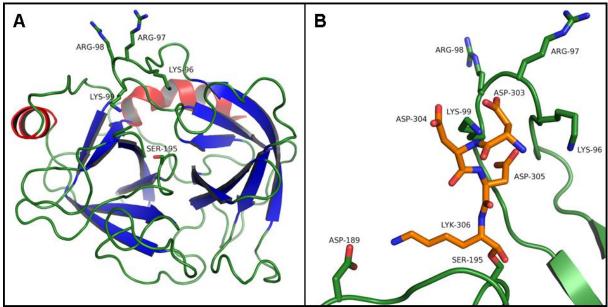


Abbildung 1.10: Struktur der leichten Kette der Enteropeptidase (PDB-Code 1EKB, Lu et al., 1999). A: Cartoondarstellung der Sekundärstrukturelemente von Enteropeptidase, α-Helices in rot, β-Stränge in blau und *loops* in grün. Das Ser195 der katalytischen Triade ist in Stabdarstellung dargestellt und liegt im Raum zwischen den zwei β-barrel Domänen. B: Stabdarstellung der Interaktion zwischen den Enteropeptidaseinhibitor Val-Asp-Asp-Asp-Lys-Chlormethylketon (C-Atome orange, N-Atome blau, O-Atome rot) und dem 99er *loop* von Enteropeptidase (C-Atome grün, N-Atome blau).

Wie bereits erwähnt (siehe 1.5.2) katalysiert Enteropeptidase die proteolytische Spaltung nach der Aminosäuresequenz Asp11-Asp12-Asp13-Asp14-Lys15 in Trypsinogen. Dabei stellt die Erkennungssequenz die P5 - P1 des Substrats dar und interagiert entsprechend mit den S5 - S1-Bindetaschen der Enteropeptidase. Am Boden der S1-Bindetasche der Enteropeptidase befindet sich wie in Trypsin ein Aspartatrest (Abbildung 1.5 B), der mit dem Lysinrest an der P1-Position interagiert. Die vier sauren Aminosäurereste in den P5 - P2-Positionen hingegen interagieren vorwiegend mit den basischen Aminosäureresten des "99er *loop*" (AS 96 - 99) der Enteropeptidase (Kitamoto *et al.*, 1994). Dabei stellen die

Aminosäurereste Lys96, Arg97, Arg98 und Lys99 Bestandteile der S4- bzw. S2-Bindetasche dar. Insbesondere Lys99 ist für die Koordination der vier Aspartate an den Positionen P5 - P2 verantwortlich (Abbildung 1.10 B, Lu *et al.*, 1999). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Enteropeptidase im allgemeinen Peptidsequenzen mit der generellen Formel $Xaa-(Asp/Glu)_n-Lys(Arg)-\downarrow-Yaa$ mit n=1-4 erkennt und proteolytisch spalten kann (Mikhailova *et al.*, 2004).

1.6 Anwendungsmöglichkeiten von Proteasen

In der Forschung sind Proteasen zu einem vielseitig einsetzbaren Werkzeug geworden. So finden sie Anwendung in der Spaltung von Fusionsproteinen, die für Reinigungs- bzw. Separierungsschritte notwendig sind. Da die meisten Proteasen spezifische Sequenzen erkennen und spalten (siehe 1.4.2), können artifizielle Erkennungssequenzen genutzt werden um die Hydrolyse spezifisch und effizient durchzuführen. Die Verwendung von Enzymen zur Spaltung von Fusionsproteinen kann chemische Methoden wie z. B. die Cyanbromidspaltung (Rais-Beghdadi et al., 1998), bei der Chemikalien als Abfall anfallen und die relativ unselektiv gegenüber allen Methioninresten ist, auf eine umweltfreundlichere Weise ersetzen. In der Biotechnologie werden vor allem die Proteasen Thrombin und Faktor Xa (Hefti et al., 2001; Jenny et al., 2003), die tobacco etch virus (TEV)-Protease (Parks et al., 1994). 3C-Proteinase (Leong, 1999) und Enteropeptidase (Liew et al., 2005) und ihre Erkennungssequenzen genutzt um Fusionsproteine oder Affinitäts-tags zu spalten. So finden eine sich selbstspaltende Granzym B Protease (Lorentsen et al., 2005; Fynbo et al., 2005) oder auch eine Caspase-6 (Purbey et al., 2005), welche zur Spaltung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen genutzt werden, Anwendung. Proteasen können außerdem zur Aktivierung von Enzymen, die als Zymogen (siehe 1.4.3) produziert wurden, genutzt werden. Dabei wird ein entsprechendes Propeptid ab- oder eine interne Peptidbindung hydrolytisch gespalten. Durch diese Spaltung erfährt das Zielprotein in den meisten Fällen eine konformationelle Änderung, wodurch der aktive Zustand und die Aktivität erhalten werden. So konnten z. B. Trypsinogene nach der heterologen Expression in E. coli und anschließender Rückfaltung und Reinigung mittels Enteropeptidase aktiviert (Rauh et al., 2002; Tziridis, 2008; Menzel, 2009) oder die ursprünglich aus Drosophila melanogaster stammende, renaturierte Protease Easter mittels Faktor Xa in ihren aktivierten Zustand überführt werden (Ursel, 2009).

Proteasen werden ebenso in der massenspektrometrischen Analyse verwendet. Dabei werden die zu untersuchenden Proteine mit entsprechenden Proteasen verdaut, um mit der anschließenden Messung den für jedes Protein individuellen *fingerprint* zu erhalten. Ebenso können auf diese Weise Peptidfragmente analysiert werden, um so gegebenenfalls das Disulfidbrückenmuster des Proteins zu erhalten (Cottrell, 1994; Ahmed, 2008).

Im industriellen Bereich finden Proteasen vor allem in der Waschmittel- und Lebensmittelindustrie Anwendung. Der Zusatz von Proteasen mit breitem pH-Optimum sowie breitem Substratspektrum und Toleranz gegenüber hohen Temperaturen wird in Waschmitteln für die proteolytische Spaltung von Eiweißbestandteilen genutzt, so dass bereits 1994 in ca. 90% der Waschmittel Proteasezusätze zu finden waren (Kottwitz und Upadek, 1994). In der Lebensmittelindustrie werden Proteasen z. B. für die Casein-Spaltung und somit für die Quark- oder Käseherstellung genutzt (Kinsella, 1984). Zudem finden Proteasen Anwendung bei der Glutenspaltung in der Backindustrie sowie bei der Erzeugung von Sojaprodukten oder der Synthese von Aspartam (Rao *et al.*, 1998).

In der Medizin können Proteasen als Biomarker für die Diagnostik dienen, da über ihre Expressionsrate oder ihre Aktivität auf Krankheiten geschlossen und diese dadurch ggf. frühzeitig erkannt werden können. So stellt Cathepsin B, ein Aβ-abbauendes Enzym, einen al., Indikator für Alzheimer dar (Miners et 2011). Eine bestimmte Urin-Matrix-Metalloprotease hingegen dient als Biomarker für Zwischenhirn- und Hypophysen-Krankheiten (Takano, 2011). Wie unter 1.1 bereits erwähnt, spielen Proteasen bei der Krebsbildung eine Rolle, so dass der Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator (uPA) ein Tumorgewebe-assozierter Biomarker für Brustkrebs darstellt (Schmitt et al., 2011). Die Protease Kallikrein 3, besser bekannt als *prostate-specific antigen* (PSA), ist ein Biomarker in der Frühdiagnose von Prostatakrebs (Sela und Doolman, 2011).

Wie unter 1.1 beschrieben und in der Abbildung 1.1 ersichtlich, sind Proteasen in der Lage die hydrolytische Spaltung von Säureamidbindungen in Peptiden oder Proteinen in Gegenwart von Wasser zu katalysieren. Gemäß dem van't Hoff-Prinzip der mikroskopischen Reversibilität (*principle of detailed balance*) (Van't Hoff J.H., 1898; Tolman, 1925) ist die Katalyse der Rückreaktion (reverse Proteolyse) jedoch ebenso möglich. Da bei dieser Reaktion ein Acyldonor und ein Acylakzeptor zu einer Säureamidbindung verknüpft werden, spricht man bei dieser Art von Reaktion auch von einer Peptid-Ligation.

Die reverse Proteolyse kann thermodynamisch oder kinetisch kontrolliert sein (Abbildung 1.11), wobei Ersteres die Umkehrung der Hydrolysereaktion darstellt

(Abbildung 1.11 A) und somit durch alle Arten von Proteasen durchgeführt werden kann (Lombard *et al.*, 2005). Die kinetisch kontrollierte reverse Proteolyse hingegen ist auf Serinund Cysteinproteasen beschränkt, da aus einem schwach aktivierten Acyldonor (R-COX) intermediär ein Acyl-Enzym gebildet wird, welches nur in den zwei genannten Proteaseklassen möglich ist. Dieses Acyl-Enzym kann durch ein Nukleophil angegriffen werden. Handelt es sich bei dem Nukleophil um Wasser, so führt das zur Hydrolyse. Erfolgt der nukleophile Angriff jedoch durch die α-Aminogruppe eines Aminosäurerests, so wird eine Peptidbindung gebildet (Abbildung 1.11 B) (Lombard *et al.*, 2005).

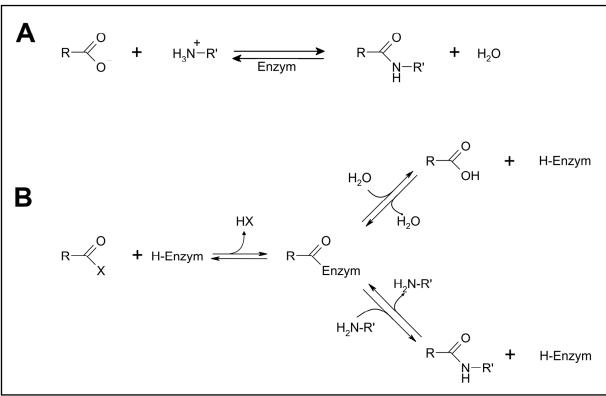


Abbildung 1.11: Reaktionsschema der durch Proteasen katalysierten reversen Proteolyse (Peptid-Ligation) durch den A) thermodynamisch und B) kinetisch kontrollierten Ansatz, wobei bei Letzterem ein Acyl-Intermediat mit der Protease gebildet wird.

Durch die Befähigung von Serinproteasen zur Peptid-Ligation liegt ein neueres Einsatzgebiet dieser Enzymklasse in der Verwendung zur Synthese von Peptiden und Proteinen. Ein Vorteil bei der Verwendung von Proteasen zur reversen Proteolyse ist, dass Enzyme die Reaktionen im Vergleich zu chemischen Ligationsmethoden in den meisten Fällen regio- und stereoselektiver durchführen (Pritz, 2008), was zu einer vollständigen Umsetzung der Ausgangsprodukte führt. Des Weiteren kann die Anwendung von Proteasen bei Ligationsreaktionen umwelttechnisch gesehen die bei chemischen Ligationen anfallenden chemischen Abfälle minimieren oder gar komplett verhindern.

Da die Hydrolyse der Peptidbindung exotherm und damit verbunden die Peptid-Ligation endotherm ist, liegt das Gleichgewicht der reversen Proteolyse unter physiologischen Bedingungen weit auf der Seite der Hydrolyse (Borsook, 1953). Aus diesem Grund muss es zu einer Optimierung bzw. Manipulierung der Proteasen, dem so genannten *protein engineering*, der Substrate (*substrate engineering*) oder der Reaktionsbedingungen (*medium engineering*) kommen, um die Gleichgewichtslage in Richtung der Bildung der Peptidbindung zu verschieben (Sewald N. und Jakubke H.D., 2002). Dabei wurden im Laufe der Zeit zahlreiche Beispiele für die Verwendung von Proteasen in der Protein- bzw. Peptidsynthese entwickelt (Bordusa und Jakubke, 2002; Bordusa, 2002a; Lombard *et al.*, 2005; Pritz *et al.*, 2008).

So führte der Austausch des katalytischen Ser221 gegen Cys in der Serinprotease Subtilisin zu einem Enzym, das Peptide ligieren kann (Abrahmsen *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1994). Bei der Optimierung der Substrate wird vor allem mit aktivierten Estern versucht, die Reaktivität der Acyldonoren zu erhöhen oder so genannte Substratmimetika zu verwenden (Grünberg *et al.*, 2000; Bordusa, 2002b; Liebscher, 2007). Hinsichtlich der Reaktionsbedingungen, unter denen die Hydrolyse unterdrückt und die Peptid-Ligation verstärkt wird, greift man auf biphasische wässrig-organische Systeme oder auf die Gegenwart komprimierter Gase zurück (Kuhl und Jakubke, 1990; Kuhl *et al.*, 1995). Ebenso bietet die Zugabe von ionischen Flüssigkeiten in ein wässriges System Vorteile bei der proteasekatalysierten Ligation im Vergleich zu rein wässrigen Reaktionspuffern (Wehofsky *et al.*, 2008).

1.6.1 EK-Trypsin

Wie oben bereits aufgeführt werden Proteasen zur hydrolytischen Spaltung von Fusionsproteinen oder auch Affinitäts-*tags* genutzt. Wie Jenny *et al.* (2003) aufführen, sind in der Literatur genügend Beispiele bekannt, wo die meist künstlich insertierten Erkennungssequenzen der Proteasen durch diese erkannt und hydrolytisch gespalten werden. Andererseits weisen andere Experimente darauf hin, dass nicht jede der künstlich eingefügten Erkennungssequenzen zwischen den Fusionspartnern für die Protease zugänglich ist, wie das z. B. für Faktor Xa gezeigt wurde (Belmouden *et al.*, 1993; Ko *et al.*, 1993). Analoge Untersuchungen, bei denen anstelle von Faktor Xa die bei der Verdauung vorkommende Protease Trypsin verwendet wurde, zeigten die Spaltung der für Faktor Xa spezifischen und künstlich insertierten Erkennungssequenz -IEGRGIP- zwischen den beiden Fusionspartnern (Belmouden *et al.*, 1993).

Die Unterschiede in den Analysen mit Trypsin und Thrombin bzw. Faktor Xa verdeutlichen den Fakt, dass Trypsin eine Verdauungsprotease ist, wohingegen Thrombin und Faktor Xa regulatorische Proteasen sind, d. h. dass Trypsin alle Peptidbindungen in Proteinen nach Lysin- und Argininresten spaltet, wohingegen Thrombin und Faktor Xa mehr spezifisch sind und nur ganz bestimmte Peptidbindungen spalten (Jenny et al., 2003). Diese unterschiedlichen Spezifitäten werden, wie unter 1.4.2 beschrieben, Aminosäuresequenz der Substratbindetaschen in den Proteasen und damit verbunden auch deren Architektur bestimmt. Untersuchungen wie z. B. von Belmouden et al. (1993) zeigen jedoch, dass weniger spezifische Proteasen wie z.B. Trypsin in der Lage sind, künstlich insertierte Erkennungssequenzen besser zu erkennen und zu hydrolysieren. Andererseits stellt Spezifität z.B. von Trypsin hinsichtlich des Angriffs anderer potentieller Erkennungssequenzen ein Problem dar. So zeigen die Untersuchungen von Belmouden et al. (1993) ebenso, dass die Spezifität von Trypsin nicht ausreicht, um zwischen der künstlich insertierten Erkennungssequenz und anderen in den Fusionsproteinen vorkommenden potenziellen Spaltsequenzen selektiv zu unterscheiden.

Mit dem Transfer von Aminosäureresten, die für die Erkennung der spezifischen Spaltsequenzen verantwortlich sind, von regulatorischen Proteasen der Trypsin-ähnlichen-Serinproteasen auf strukturell verwandte Verdauungsproteasen könnte so die Spezifität übertragen werden, ohne dass die Architektur der Substratbindetaschen verändert wird. Dadurch könnten Proteasen generiert werden, die nun spezifischer zwischen Erkennungssequenzen unterscheiden und trotzdem den oben genannten Vorteil der Zugänglichkeit von Verdauungsproteasen zu den Erkennungssequenzen beinhalten. Andererseits könnten neue bzw. veränderte Spezifitäten dadurch erhalten werden, indem selektitiv bestimmte Substratbindetaschen ausgetauscht werden.

Doch genau dieses rationale, strukturbasierte Enzymdesign von Trypsin-ähnlichen Serinproteasen führt nicht in allen Fällen zur erfolgreichen Modifizierung der Spezifität. Der Austausch des im Trypsin natürlich vorkommenden Asp 189 gegen Ser, welches in der verwandten Protease Chymotrypsin an dieser Position vorkommt, führt zu einer nicht-spezifischen Protease mit einer im Vergleich zum Wildtypenzym geringeren Hydrolyseaktivität und nicht, wie zunächst erwartet, zu einer Protease Chymotrypsin-ähnlicher Spezifität (Graf et al., 1988). Untersuchungen zeigten, dass es insgesamt 15 Aminosäureaustausche bedarf, um die Spezifität von Trypsin auf Chymotrypsin zu übertragen (Hedstrom et al., 1992; Perona et al., 1995; Perona und Craik, 1995). Daraus wird deutlich, dass die Überführung der Spezifität und Aktivität zwischen strukturell verwandten Proteasen nicht trivial ist. Des Weiteren zeigte sich, dass das rationale Enzymdesign bei der Übertragung der Aktivität von Elastase auf Trypsin zu Proteasevarianten führt, die Substrate spezifischer als das Wildtypenzym erkennen können. So ist die katalytische Effizienz einer Elastase-ähnlichen Trypsin-Variante gegenüber Alanin im Vergleich zu Phenylalanin an der P1-Position 160-fach höher, wohingegen Wildtyp-Elastase Alanin gegenüber Phenylalanin um das 50-fache bevorzugt (Hung und Hedstrom, 1998). Der Vergleich zwischen den Proteasevarianten und der Wildtyp-Elastase verdeutlicht jedoch, dass der Wert der katalytischen Effizienz des Wildtypenzyms keineswegs erreicht werden konnte. Ähnlicherweise zeigten Versuche, das aktive Zentrum der Serinprotease Faktor Xa auf Trypsin zu übertragen, dass das rationale, strukturbasierte Enzymdesign zu einer Beeinflussung der Sekundärstrukturelemente führt (Stubbs *et al.*, 1995). In diesem Fall kommt es je nach Aminosäureaustausch zu einer hohen Flexibilität der "intermediären Helix" und damit verbunden zu unterschiedlichen Affinitäten von Inhibitoren (Rauh *et al.*, 2002; Reyda *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2004).

Studien des rationalen, strukturbasierten Enzymdesigns an Serinproteasen, welche eine strukturelle Verwandtschaft zueinander aufweisen, verdeutlichen jedoch ebenfalls, dass die Übertragung von Spezifitäten bzw. die Generierung neuer Spezifitäten zwar schwierig, jedoch nicht unmöglich ist. Dabei diente Trypsin, wie oben bereits für einige Beispiele beschrieben, in bisherigen Untersuchungen aufgrund seiner sehr gut charakterisierten Eigenschaften als Modellprotease für den Transfer von Spezifitäten zwischen strukturell zueinander verwandten Serinproteasen (Perona *et al.*, 1993; Perona *et al.*, 1994; Brinen *et al.*, 1996; Hung und Hedstrom, 1998; Kurth *et al.*, 1998; Rauh *et al.*, 2002; Reyda *et al.*, 2003; Rauh *et al.*, 2004; Page *et al.*, 2006; Tziridis, 2008; Menzel, 2009; Page und Di Cera, 2010).

Ein weiteres Beispiel für die mögliche Übertragung der Spezifität zwischen strukturell verwandten Vertretern der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen stellt die von Tziridis (2008) generierte Variante S96K/N97R/T98R/L99K-Trypsin dar. Mit dem Aminosäureaustauschen an den Positionen 96 - 99 (99er loop) wurden Aminosäurereste der S4- und S2-Bindetaschen, welche bei der Erkennung der spezifischen Spaltsequenz -DDDDK-Enteropeptidasesubstraten eine entscheidende Rolle spielen (siehe 1.5.3), von Enteropeptidase auf bovines kationisches Trypsin transferiert. Das Ziel dieser Übertragung war die Entwicklung einer Trypsin-Variante mit einer Enteropeptidase-ähnlichen Spezifität gegenüber Substraten mit der von Enteropeptidase vornehmlich erkannten DDDDK-Erkennungssequenz (siehe 1.5.3). Aufgrund des Transfers und der damit vermuteten Enteropeptidase-ähnlichen

Spezifität wurde die S96K/N97R/T98R/L99K-Trypsin-Variante als "Enteropeptidase-*like*"-bzw. "Enterokinase-*like*"-Trypsin (EK-Trypsin) bezeichnet.

Bei der erfolgreichen Überführung der Spezifität von Enteropeptidase auf Trypsin könnte bei möglichen diese Trypsin-Variante einer biotechnologischen Spaltung Fusionsproteinen, welche durch eine Enteropeptidase-Erkennungssequenz verknüpft sind, Anwendung als Restriktionsprotease finden, wobei EK-Trypsin mit den bereits etabilierten Expressions-, Rückfaltungs- und Reinigungsprotokollen (Rauh et al., 2002; Rauh et al., 2003; Rauh et al., 2004; Reyda et al., 2003; Tziridis, 2008) eine kostengünstige Alternative zu kommerzieller Enteropeptidase darstellen könnte. Des Weiteren könnte EK-Trypsin bei Fusionsproteinen eingesetzt werden, bei denen die künstlich insertierte Erkennungssequenz für Enteropeptidase nicht zugänglich ist, wie dies oben bereits für die Proteasen Faktor Xa und Thrombin dargelegt wurde. Hierbei könnte die Insertion des 99er loops möglicherweise zu einer selektiveren Spaltung der Erkennungssequenz im Vergleich zu anderen potentiellen Spaltsequenzen für Trypsin führen. Einen weiteren Vorteil könnte EK-Trypsin dahingehend bieten, dass dessen Zymogen (EK-Trypsinogen) die DDDDK-Erkennungssequenz enthält und somit eine potentielle Selbstaktivierung möglich wäre. Dadurch könnte ein Einsatz von EK-Trypsin in seiner Zymogenform, ähnlich wie bereits für Granzym B gezeigt (Lorentsen et al., 2005; Fynbo et al., 2005), stattfinden. Ein Vorteil dabei wäre die Unterdrückung eines möglichen vorzeitigen Selbstverdaus der Protease z.B. während der Lagerung, da die Aktivität der Protease erst generiert wird, nachdem sie sich durch die Abspaltung des Propeptids (siehe 1.5.2) selbstaktiviert hat, was dann im Reaktionsansatz mit dem Substrat vonstatten gehen könnte.

Nach der Generierung von EK-Trypsin zeigten erste Experimente mit Fusionsproteinen, dass diese gespalten werden können, was auf den erfolgreichen Transfer der Spezifität für Enteropeptidasesubstrate schließen lässt. Ebenso zeigt die Kristallstruktur von EK-Trypsin in Gegenwart von Benzamidin, dass durch die Aminosäureaustausche die Sekundär- und Tertiärstruktur im Vergleich zum Wildtypenzym unbeeinflusst ist (Tziridis, 2008). Erste Messungen hinsichtlich der Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen zu EK-Trypsin zeigten, dass diese stattfindet.

1.6.2 Trypsiligase

Wie oben bereits erwähnt finden Proteasen Verwendung im Bereich der enzymvermittelten Peptid-Ligation. Da die Vertreter der Serinproteasen hinsichtlich ihres Reaktionsmechanismus aber auch hinsichtlich ihrer dreidimensionalen strukturellen Eigenschaften sehr gut charakterisiert sind, kann durch rationales, strukturbasiertes Enzymdesign eine Optimierung der Enzyme (*protein engineering*) stattfinden.

Die Variante S221C/P225A-Subtilisin zeigt eine zehnfach höhere Ligaseaktivität bei einer hundertfach verminderten Amidaseaktivität im Vergleich zum Wildtyp-Enzym (Abrahmsen *et al.*, 1991). Versuche mit S221C/P225A-Subtilisin und dem humanen Wachstumsfaktor zeigten, dass dieser an synthetische Peptide, die entweder biotinyliert oder an Schwermetalle wie Quecksilber geknüpft waren, ligiert werden konnte (Chang *et al.*, 1994). Die Subtilisin-Variante S221C/P225A wurde aufgrund des Ursprungsenzyms <u>Subti</u>lisin und aufgrund der Ligase-Aktivität "Subtiligase" genannt.

Hinsichtlich der Optimierung der Reaktionsbedingungen kann die Verwendung von organischen Lösungsmitteln als Kosolvens die reverse Proteolyse begünstigen. So konnten Peptidfragmente von RNAse A oder auch Thermolysin in Gegenwart von 1-Propanol oder 2-Propanol enzymatisch mit Hilfe der V8-Protease ligiert werden (Kumaran et al., 1997). Die Durchführung der Reaktion bei 0°C bei der enzymatischen Semisynthese von Calcitonin-Analogen mittels Chymotrypsin zeigte eine zufriedenstellende Ausbeute, bei der der gesamte Acyldonor umgewandelt wurde (Cerovsky et al., 1997). Andererseits zeigen diese Untersuchungen auch, dass es neben der Bildung des gewünschten synthetisierten Substrats ebenso zur Proteolyse der Substrate kommt (Cerovsky et al., 1997). Die Trypsin-vermittelte Semisynthese von Calcitonin unter optimierten Reaktionsbedingungen führte so zu einer Umwandlung des eingesetzten Substrats von nur 30% in das gewünschte Produkt (Davey et al., 1995). Diese Beispiele zeigen, dass die Optimierung der Reaktionsbedingungen in einigen Fällen nicht ausreichen, um die Hydrolyse ganz zu unterdrücken und hohe bis quantitative Ausbeuten der Syntheseprodukte zu erhalten. Eine Kombination aus Protease-, Substrat- und Reaktionsoptimierung könnte einen möglichen Lösungsansatz für die Erhöhung der Ausbeuten bei der enzymvermittelten Synthese von Peptidfragmenten darstellen.

Durch Bordusa und Mitarbeiter wurde durch strukturbasiertes Enzymdesign die Variante K60E/N143H/E153H/D189K des anionischen Rattentrypsins generiert, welche sowohl Aktivitäten für die Proteolyse als auch für die reverse Proteolyse unter milden

Reaktionsbedingungen besitzt (Liebscher, 2007). Da diese Rattentrypsin-Variante eine Aktivität für die Peptid-Ligation besitzt, wurde diese, analog zur oben beschriebenen Subtiligase (Chang *et al.*, 1994), als "Trypsiligase" bezeichnet. Da es sich hierbei um eine Variante des anionischen Rattentrypsins handelt, wird für diese Isoform im Folgenden die Abkürzung "r-Trypsiligase" für "*rat*-Trypsiligase" verwendet.

R-Trypsiligase besitzt aufgrund ihrer Mutationen eine im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin veränderte Proteolysespezifität. R-Trypsiligase weist ihre Spezifität nicht mehr gegenüber basischen Aminosäureresten (Lys/Arg) in der P1-Position auf, sondern gegen die Aminosäuresequenz Tyr-Arg-His (YRH) mit der hydrolytischer Spaltung zwischen Tyr und Arg (Tyr-\-Arg-His). Das Tyrosin interagiert dabei mit der modifizierten (Asp189Lys) S1-Bindetasche, das Arginin mit der modifizierten (Lys60Glu) S1'-Bindetasche und das Histidin mit der modifizierten (Asn143His und Glu151His) S2'-Bindetasche. Die zwei Mutationen Asp143His und Glu151His sorgen in der S2'-Bindetasche dafür, dass dort eine künstliche Metallbindestelle entsteht, an der sowohl Kupfer- als auch Nickel- oder Zinkionen koordinativ gebunden werden können (Willett et al., 1995; Willett et al., 1996; Brinen et al., 1996). Dabei zeigte sich für r-Trypsiligase, dass in Gegenwart von Zn²⁺-Ionen die höchsten Ausbeuten für die proteolytische Spaltung wie auch für die Peptid-Ligation erreicht wurden (Liebscher, 2007). Die eingeführten Mutationen haben hinsichtlich der katalytischen Effizienz den Einfluss, dass diese im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin um vier Größenordnungen herabgesetzt ist. So liegt die katalytische Effizienz von r-Trypsiligase gegenüber dem besten Substrat bei ca. $4 \times 10^2 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{s}^{-1}$ (Liebscher, 2007), wohingegen Wildtyp-Trypsin z. B. gegenüber Pefachrome tPA eine katalytische Effizienz von ca. $5 \times 10^6 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{s}^{-1}$ besitzt (Auerswald, 2011).

Aufgrund der bekannten strukturellen Eigenschaften von Trypsin konnte ein schematisches Modell der möglichen Interaktionen zwischen der von r-Trypsiligase bevorzugt erkannten YRH-Sequenz und den entsprechenden Substratbindetaschen erstellt werden (Abbildung 1.12).

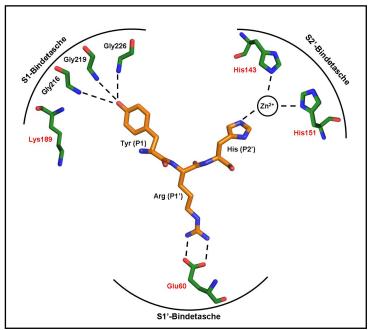


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung der möglichen Erkennung der YRH-Substratsequenz durch r-Trypsiligase. Gezeigt sind mögliche Interaktionen der S1-, S1'- und S2'-Bindetaschen von Trypsiligase (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit den entsprechenden P1-, P1'- und P2'-Resten des Substrats (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau, O-Atome rot). Dabei sind die in r-Trypsiligase im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin veränderten Aminosäurereste rot nummeriert wohingegen unveränderte Aminosäurereste eine schwarze Nummerierung tragen.

Die reverse Proteolyse, Peptid-Ligation oder auch Acyltransfer genannt, kann durch r-Trypsiligase mit einem Acylakzeptor, der N-terminal die Arg-His-Sequenz besitzt, durchgeführt werden. Dabei eignen sich Guanidinophenylester-modifizierte Peptide am besten als Acyldonatoren. Von der Art der Bindung ist bekannt, dass bereits einfache Alkylester 3×10^3 -fach reaktiver sind als eine Amidbindung, wobei Verbindungen wie z. B. p-Nitrophenylester um das 3×10^5 -fache reaktiver sind (Hedstrom, 2002). Die Erhöhung der Ausbeuten und der katalytische Effizienz unter Verwendung solch aktivierter Esterverbindungen als Substratmimetika wurde bereits für andere Trypsin-Varianten gezeigt (Rall und Bordusa, 2002; Bordusa, 2002b).

Die von Liebscher (2007) durchgeführten Peptid-Ligationen unter Verwendung von r-Trypsiligase fanden dabei unter milden Reaktionsbedingungen ohne Zusatz von organischen Lösungsmitteln statt, wobei in den meisten Fällen quantitative Ausbeuten des Produktes erhalten wurden. Das Vorhandensein von Zn²⁺-Ionen als Kofaktor war ebenso wie in den oben beschriebenen Proteolysestudien notwendig, da die Zn²⁺-Ionen den Histidinrest des Acylakzeptors in der S2'-Bindetasche mit den zwei durch die Mutationen in r-Trypsiligase eingeführten Histidinreste komplexieren. So konnten mit Hilfe von r-Trypsiligase N-terminale Modifikationen an humanem EGF, humanem Cyclophilin 18, *E. coli* Parvulin 10 und humanem Pin1 mit Sonden wie den Farbstoffen TAMRA, Carboxyfluorescein oder Alexa

Fluor 488, mit Polymeren wie PEG 2000 oder Affinitätsmarkern wie Biotin durchgeführt werden (Liebscher, 2007). Es zeigte sich bei diesen Analysen, dass sowohl die proteolytische Spaltung der von r-Trypsiligase bevorzugten YRH-Sequenz als auch die N-terminale Peptid-Ligation an den daraus resultierenden Acylakzeptor mit der RH-Sequenz in einem Reaktionsansatz stattfinden kann (Abbildung 1.13). Diese "Ein-Topf-Reaktion" führte in den meisten Fällen ebenso zu quantitativen Ausbeuten (Liebscher, 2007).

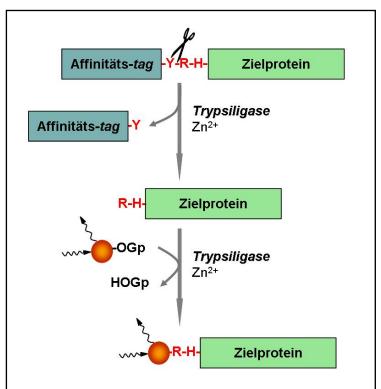


Abbildung 1.13: Schematische Darstellung der von Trypsiligase durchführbaren Hydrolyse- und Ligationsreaktion (modifiziert nach Liebscher, 2007). Das Reaktionsschema zeigt im oberen Teil die hydrolytische Spaltung der YRH-Erkennungssequenz zwischen dem Tyrosin- und dem Argininrest. In Gegenwart eines Peptides (gekoppelt z. B. an einen Fluoreszenzfarbstoff), welches mit einem Guanidinophenylrest (OGp) als Substratmimetikum verestert ist, kann die Ligation dieses Peptides N-terminal an die RH-Erkennungssequenz erfolgen. Das Schema verdeutlicht, dass beide Reaktionen in einer "Ein-Topf-Reaktion" durchgeführt werden können.

Für strukturelle Analysen wurden die analogen Mutationen von r-Trypsiligase auch auf das kationische Rindertrypsin übertragen. Der Vorteil der Verwendung der Trypsiligase basierend auf kationischem Rindertrypsin sollte darin liegen, dass dieses ein einfacheres Kristallisationsverhalten im Vergleich zum anionischen Rattentrypsin aufweist. So findet man in der Proteindatenbank (PDB, http://www.pdb.org) für Trypsin aus dem Organismus *Bos taurus* 485, für *Rattus norvegicus* 32 und für *Rattus rattus* lediglich 8 Einträge (Stand 08.11.2012). Die so generierte Variante K60E/N143H/Y151H/D189K-Trypsin wurde Aufgrund des Ursprungsorganismus als "b-Trypsiligase" für "*bovine*-Trypsiligase" abgekürzt.

Mit b-Trypsiligase lassen sich analog zu r-Trypsiligase die Hydrolyse und die Peptid-Ligation durchführen. Dabei zeigt b-Trypsiligase gegenüber dem Estersubstrat Ac-Tyr-oMe eine initiale Hydrolysegeschwindigkeit von 9,7% im Vergleich zu der initialen Hydrolysegeschwindigkeit von r-Trypsiligase für dieses Substrat.

1.7 Zielstellungen

Für Proteasen, welche für die hydrolytische Spaltung verantwortlich sind, ist eine Vielzahl von unterschiedlichen Spaltpräferenzen bekannt (Rawlings et al., 2010). Zudem sind die Die Strukturen vieler Proteasen aufgeklärt. Mitglieder der Trypsinbzw. Chymotrypsin-ähnlichen Serinproteasen, auch bekannt als S1A Proteinasen, bilden eine Enzymfamilie, die hinsichtlich ihrer Biochemie, ihres Mechanismus und ihrer Struktur bestens charakterisiert ist (Hedstrom, 2002). Jedoch umfassen die bis dato bekannten Spezifitäten von Proteasen nur ein gegrenztes Spektrum aller möglichen Substratspaltstellen, so dass die Suche nach neuen Proteasen oder die Veränderung bzw. Optimierung bereits bekannter Proteasen für die Entwicklung neuer Spezifitäten ein interessantes Gebiet der Wissenschaft darstellt.

1.7.1 EK-Trypsin

Im ersten Teil dieser Dissertation sollte die bereits beschriebene Variante S96K/N97R/T98R/L99K-Trypsin (EK-Trypsin, Tziridis, 2008) hinsichtlich ihrer Spezifität analysiert werden. Dabei sollte die Autolyse, also die Selbstaktivierung aus EK-Trypsinogen, kinetisch analysiert werden, um einen möglichen Einsatz von EK-Trypsinogen als selbstaktivierende Restriktionsprotease, wie im Falle von Granzym B, zu testen.

Die Spaltung und Aktivierung von Trypsinogen, dem natürlichen Substrat von Enteropeptidase (siehe 1.5.3), sollte Aufschluss über die mögliche Übertragung der Spezifität von Enteropeptidase im generierten EK-Trypsin geben. Die Bestimmung der kinetischen Parameter der enzymatischen Aktivität des gespaltenen Trypsinogens sollte dabei eine quantitative Aussage zur Spezifität von EK-Trypsin im Vergleich zu Enteropeptidase und Trypsin zulassen. Des Weiteren sollte die Analyse der Spaltbarkeit verschiedener Substrate, welche über eine Enteropeptidase-Erkennungssequenz verfügen, zeigen, ob EK-Trypsin als Restriktionsprotease zur Spaltung von Fusionsproteinen, von Affinitäts-tags oder zur Aktivierung von Zymogenen als biotechnologisches Werkzeug verwendet werden kann.

1.7.2 Trypsiligase

Da das erstellte Modell (Abbildung 1.12) lediglich die entsprechenden Positionen der interagierenden Reste des Substrates mit den korrespondierenden Substratbindetaschen in Trypsiligase beschreibt, sollten im zweiten Teil dieser Dissertation Interaktionsstudien mit Pseudo-Substraten und Strukturanalysen von r-Trypsiligase sowie von b-Trypsiligase durchgeführt werden.

Ein Teilziel dieser Arbeit war, mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse die Strukturen von r-Trypsiligase und b-Trypsiligase aufzuklären und damit auf molekularer Ebene Gemeinsamkeiten und Unterschiede zum Wildtyp-Trypsin aufzudecken. Weiterhin sollten soaks bzw. Kokristallisationsversuche mit Substraten bzw. Produkten die vorhandenen Interaktionen zu Trypsiligase aufklären. Andererseits könnte die Kokristallisation mit einem makromolekularen Inhibitor, welcher als Pseudo-Substrat mit Trypsiligase wechselwirkt, über die Interaktionen zwischen der generierten Trypsiligase und dessen Substraten Aufschluss geben.

Daraus sollte im Idealfall eine Erklärung für die durch Trypsiligase katalysierte Peptid-Ligation geschlussfolgert werden können. Diese Untersuchungen sollten die strukturelle Basis bilden, um möglicherweise Aufschluss über den Mechanismus der Ligation auf atomarer Ebene zu liefern. Mit der Erkenntnis der molekularen Details könnte die Strategie des gezielten Enzymdesigns für andere Serinproteasen hinsichtlich der Verschiebung der Aktivität hin zur Ligationsreaktion optimiert werden. Dies ist vor allem dahingehend von Interesse, um chemische Ligationsverfahren zukünftig noch mehr durch enzymvermittelte Ligationsverfahren ersetzen zu können.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

E. coli XL1 Blue:

Stratagene, Heidelberg

{E. coli recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacl^q Z∆M15 Tn10 (Tet^r)]}

E. coli BL21 (DE3)

Novagen, Darmstadt

[E. coli B F dcm ompT hsdS_B $(r_B m_B)$ gal λ (DE3)]

2.1.2 Plasmide

bovines Trypsinogen in pET-3a, Amp^r

(Rauh et al., 2002)

bovines S96K/N97R/T98R/L99K-Trypsinogen

(Tziridis, 2008)

in pET-3a mit zusätzlichem C-terminalen His6-tag, Amp^r

L45K-Eglin C in pET-15b HisTEV-Prot, Amp^r

(Menzel, 2009)

2.1.3 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried, Deutschland) hergestellt. Die für die Einführung der Mutationen ausgetauschten Basen sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Mutagenese-Primer L45A/L47H-Eglin C

Vorwärts-Primer:

5'-GGC AGC CCG GTG ACC GCA GAT CAT CGT TAT AAC CGT GTG-3'

Rückwärts-Primer:

5'-CAC ACG GTT ATA ACG ATG ATC TGC GGT CAC CGG GCT GCC-3'

Mutagenese-Primer L45Y/L47H-Eglin C

Vorwärts-Primer:

5'- GGC AGC CCG GTG ACC TAT GAT CAT CGT TAT AAC C-3'

Rückwärts-Primer:

5'-G GTT ATA ACG ATG ATC ATA GGT CAC CGG GCT GCC-3'

2.1.4 Standards und Kits

1-kb-DNA-Leiter NEB, Frankfurt (Main)

SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad range BIO-RAD, München

[Myosin (200 kDa), β-Galactosidase (116,25 kDa), Phosphorylase b

(97,4 kDa), Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa),

Carboanhydrase (31 kDa), Trypsininhibitor (21,5 kDa), Lysozym

(14,4 kDa), Aprotinin (6,5 kDa)]

Kristallisations-Screening-Kits Hampton Research, Molecular

Dimension, Sigma-Aldrich, Jena

Bioscience (siehe Anhang A.2)

Kristallisations-Additiv-Screening-Kit Sigma-Aldrich, Steinheim

GeneJET Plasmid Miniprep Kit Fermentas, St. Leon-Roth

QuikChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit Stratagene, Heidelberg

2.1.5 Enzyme und Peptide

Benzonase Nuclease Sigma-Aldrich, Steinheim

Dpn I NEB, Frankfurt (Main)

Lysozym Sigma-Aldrich, Steinheim

Pefachrome tPA® Pentapharm AG, Basel Schweiz

Pfu-Turbo-DNA-Polymerase Stratagene, Heidelberg

Rinderenteropeptidase (leichte Kette)

Sigma-Aldrich, Steinheim

bovines, pankreatisches Trypsinogen Sigma-Aldrich, Steinheim

Sigma-Aldrich, Steinheim bovines, pankreatisches Trypsin

Sojabohnen-Trypsininhibitor Serva, Heidelberg

2.1.6 Nährmedien

5 g l⁻¹ Hefeextrakt, 10 g l⁻¹ NaCl, Lysogeny broth (LB)-Flüssigmedium

10 g l⁻¹ Trypton

LB-Agarplatten wie LB-Flüssigmedium + 1%

(w/v) Agar-Agar

5 g l⁻¹ Hefeextrakt, 20 g l⁻¹ Super optimal catabolite repression-Medium

Trypton, 10 mM NaCl, 10 mM (SOC-Medium)

KCl, 10 mM MgCl, 10 mM

MgSO₄, 0,8% (w/v) Glucose

2.1.7 Chemikalien

Acetonitril (ACN) Roth, Karlsruhe

Acrylamid Roth, Karlsruhe

Agar-Agar Applichem, Darmstadt

Agarose Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe Ammoniumperoxodisulfat

Ampicillin, Natriumsalz Roth, Karlsruhe

Borsäure Roth, Karlsruhe

Roth, Karlsruhe Bromphenolblau

Calciumchlorid Dihydrat Roth, Karlsruhe

Coomassie Brillant Blau G250 Roth, Karlsruhe

Merk, Darmstadt Dithiothreitol (DTT) Applichem, Darmstadt

Essigsäure (AcOH) VWR, Darmstadt

Ethanol (EtOH) Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid Roth, Karlsruhe

Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Sigma-Aldrich, Steinheim

Dihydrat (EDTA)

Coomassie Brillant Blau R250

Formaldehyd Roth, Karlsruhe

Materialien und Methoden

α-D-Glucose Monohydrat Roth, Karlsruhe

Glutathion, oxidiert (GSSG) Sigma-Aldrich, Steinheim

Glutathion, reduziert (GSH) Fluka, Steinheim

Glycerin 87% Sigma-Aldrich, Steinheim

Glycerin 98% Roth, Karlsruhe

Guanidiniumchlorid (GdmCl) NIGU Chemie, Waldkraiburg

Hefeextrakt Roth, Karlsruhe
HEPES Roth, Karlsruhe
Imidazol Merck, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalaktosid (IPTG) Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid Roth, Karlsruhe

L-Arginin Ajomoto, Hamburg

Magnesiumchlorid HexahydratRoth, Karlsruheβ-MercaptoethanolMerck, DarmstadtMethanolRoth, KarlsruheNatriumcarbonatRoth, Karlsruhe

Natriumchlorid (NaCl) Roth, Karlsruhe

Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat Roth, Karlsruhe

Natriumdodecylsulfat (SDS) Merck, Darmstadt

Natriumhydroxid (NaOH) Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat Roth, Karlsruhe

Polyethylenglycol (PEG) Merck, Darmstadt

Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF) Sigma-Aldrich, Steinheim

Propan-2-ol (Isopropanol)

Salzsäure 37% (w/v) (HCl)

VWR, Darmstadt

VWR, Darmstadt

Silbernitrat

Roth, Karlsruhe

Tetramethylethylendiamin

Roth, Karlsruhe

Trichloressigsäure (TCA)

Fluka, Steinheim

Trifluoressigsäure (TFA)

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) Roth, Karlsruhe

Trypton Roth, Karlsruhe

Bei der Herstellung von Lösungen und Puffern wie auch bei enzymatischen Reaktionen wurde bidestilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Eglin C-Varianten

Mit dem QuikChangeTM *Site-Directed Mutagenesis Kit* (2.1.4) wurden die Mutationen in das Gen für L45K-Eglin C, welches im Vektor pET-15b HisTEV-Prot (Eckhard *et al.*, 2008) als *template* vorlag, unter Verwendung der entsprechenden Mutagenese-Primer (2.1.3) eingeführt. 40 ng des *templates* wurden mit je 125 ng der Vorwärts- und Rückwärts-Primer versetzt. Der 25 μl Ansatz bestand somit aus:

2,5 μl	10 × Polymerase-Puffer
1 μ1	dNTP-Mix (10 mM)
1,25 μl	Vorwärts-Primer (125 ng)
1,25 μl	Rückwärts-Primer (125 ng)
1 μ1	template (40 ng)
0,5 μ1	Pfu-Turbo-DNA-Polymerase
17,5 μl	ddH_2O

Die anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte dann in einen Thermocycler (Thermocycler Mastercycler Gradient, Eppendorf, Hamburg) mit folgendem *Cycle*-Profil:

Die durch die PCR erhaltenen *amplicons* wurden mit 1 μl *Dpn* I (2.1.5) für 2 h bei 37 °C inkubiert. Dieser Schritt diente zum Abbau der methylierten, parentalen DNA durch *Dpn* I, das die neusynthetisierte, unmethylierte DNA nicht angreift.

2.2.2 Agarosegel-Elektrophorese

Die Analyse der *amplicons* erfolgte mit 1%-igen (w/v) Agarosegelen. Dazu wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA pH 8,0) für 2 min in einer Mikrowelle bei 600 W erhitzt. Die erhitzte Agarose wurde mit 2 Tropfen Ethidiumbromidlösung (0,025%) versetzt, um die spätere Detektion der DNA zu gewährleisten. Die DNA-Proben wurden mit 3 × DNA Probenpuffer [49,95% (v/v) Glycerin, 0,05% Bromphenolblau, 50% (v/v) TAE-Puffer] versetzt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Agarosegel-Elektrophorese (Consort E835 Elektrophorese Power Supply, Sigma-Aldrich, Steinheim) wurde bei 90 V für 50 min durchgeführt, wobei als Laufpuffer TAE-Puffer verwendet wurde. Anschießend erfolgte die Detektion der DNA mittels UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm, dabei konnte durch das Mitführen einer 1-kb-DNA-Leiter (2.1.4) die Größe der Fragmente abgeschätzt werden.

2.2.3 Transformation in chemisch kompetente Zellen

1 μl der Plasmid-DNA (2.2.1) wurde mit 100 μl chemisch kompetenter *E. coli* XL1 Blue-Zellen versetzt und für 30 min auf Eis stehen gelassen. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte anschließend bei 42 °C für 90 s. Die Zellsuspension wurde danach für 1 min auf Eis abgekühlt und es folgte die Zugabe von 800 μl SOC-Medium (2.1.6). Bevor der Ansatz auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten (2.1.6) ausplattiert wurde und eine Inkubation für mindestens 16 h bei 37 °C stattfand, wurden die Zellen im SOC-Medium für 1 h bei 37 °C geschüttelt.

2.2.4 Isolierung der Plasmid-DNA

E. coli XL1 Blue-Einzelkolonien, die auf den Agarplatten gewachsen sind, wurden in 5 ml LB-Flüssigmedium (2.1.6) mit 100 μg ml⁻¹ Ampicillin gegeben und unter kontinuierlichem Schütteln für mindestens 16 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Plasmid-DNA-Isolierung mit Hilfe des *GeneJET Plasmid Miniprep Kits* (2.1.4) nach Herstellerprotokoll. Die isolierte DNA wurde dann durch die Firma GATC (Konstanz) sequenziert, um die Korrektheit der Sequenz und die erfolgreiche Einführung der entsprechenden Mutationen zu überprüfen.

2.3 Genexpression und Reinigung von EK-Trypsinogen

2.3.1 Genexpression von EK-Trypsinogen

Wie durch Tziridis (2008) beschrieben konnte die ortsgerichtete Mutagense für EK-Trypsinogen im pET-3a Vektor, der das Gen für bovines Trypsinogen enthielt, erfolgreich durchgeführt werden. So dass das Konstrukt des bovinen S96K/N97R/T98R/L99K-Trypsinogens in pET-3a mit zusätzlichen C-terminalen His₆-tag (2.1.2) zum Beginn dieser Arbeit zur Verfügung stand.

Für die Genexpression wurde die Plasmid-DNA, wie unter 2.2.3 beschrieben, in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert und anschließend für 16 h in einer 50 ml Vorkultur (LB-Medium, 100 μg ml⁻¹ Ampicillin) bei 37 °C angezogen. Die Hauptkultur (4 × 1,25 l LB-Medium, 100 μg ml⁻¹ Ampicillin) wurde in einen Volumenverhältnis von 1:250 mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 150 rpm (Schüttelinkubator SM-30/TM-30, Edmund Bühler GmbH, Tübingen) bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 (UV/VIS-Spektrometer Ultraspec3300 Pro, Amersham Biosciences, Freiburg) angezogen. Danach erfolgte die Genexpression durch Induktion der Zellen mit IPTG (Endkonzentration 1 mM). Nach Induktion wurden die Ansätze für weitere 3 h bei 37 °C kultiviert. Anschließend erfolgte die Zellernte durch Zentrifugation (AvantiTM J-20 Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bei 5040 × *g* für 30 min.

2.3.2 Zellaufschluss und inclusion body (IB)-Isolierung von EK-Trypsinogen

Pro Gramm geernteter Zellen wurden 4 ml Aufschlusspuffer (0,1 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,0) für den Zellaufschluss zugegeben und die Zellen wurden mit einem Ultraturrax (Jahnke und Kunkel IKA-Labortechnik, Stauffen) resuspendiert. Nach der Resuspendierung wurden 1,5 mg Lysozym (2.1.5) pro Gramm Zellen zugegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss mittels Hochdruckdispersion (Gaulin Micron Lab 40, APV Homogenisator GmbH, Lübeck) bei einen Druck von 1200 bar (3 Durchgänge).

Danach erfolgte für EK-Trypsinogen, welches wie alle anderen in der Arbeitsgruppe generierten Trypsin-Varianten (Rauh *et al.*, 2002; Tziridis, 2008; Menzel, 2009; Auerswald, 2011) als unlösliche Einschlusskörper vorlag, die *inclusion body* (IB)-Isolierung und anschließende Solubilisierung nach etablierten Protokollen (Rudolph und Lilie, 1996). Das

Solubilisat wurde nach dem finalen Dialyseschritt bei 7 °C gegen 4 M GdmCl, pH 3,5 durch Zentrifugation für 20 min bei $108.000 \times g$ (AvantiTM J-30 I Zentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt und anschließend bei -80 °C bis zur Renaturierung gelagert.

2.3.3 Renaturierung von EK-Trypsinogen

Die Renaturierung des solubilisierten, denaturierten EK-Trypsinogens erfolgte nach modifizierten Vorschriften von Rudolph *et al.* (1997) und Rauh *et al.* (2002) bei 7 °C mittels Pulsrenaturierung in einen 2 l Rückfaltungsreaktor (2 l Rückfaltungsreaktor mit Rührblatt und Peristaltikpumpe, FairMenTec, Göttingen). Dabei wurde die Konzentration an Arginin im Rückfaltungspuffer modifiziert, so dass der verwendete Rückfaltungspuffer anstatt 0,7 M Arginin für diese Rückfaltung 1 M Arginin enthielt und aus folgenden Komponenten bestand: 100 mM Tris-HCl, 100 mM Borsäure, 1 M Arginin, 1 mM EDTA, 60 mM CaCl₂, 0,3 mM GSSG, 3 mM GSH, pH 8,5.

200 mg solubilisiertes Protein wurde in 10 Einheiten (20 mg Protein pro Einheit, 12 h zwischen den einzelnen Einheiten) in 21 Rückfaltungspuffer gepulst, so dass die finale Trypsinkonzentration im Rückfaltungspuffer 10 μg ml⁻¹ betrug. Anschließend wurde der Renaturierungsansatz mittels einer *Cross-Flow*-Filtrationsanlage (VivaFlow 200, Sartorius, Göttingen) auf ein Zehntel seines ursprünglichen Volumens aufkonzentriert und zwei Mal gegen 2 1 0,5 M Na-Acetat, 20 mM CaCl₂, pH 4,0 dialysiert. Angefallene Aggregate wurden durch Zentrifugation für 30 min bei 108.000 × *g* abgetrennt.

2.3.4 Reinigung von EK-Trypsinogen mittels Affinitätschromatographie

EK-Trypsinogen besitzt durch die Klonierung in den pET-3a Vektor am N-Terminus einen hexa-Histidin-*tag* (His₆-*tag*). Zusätzlich wurde für eine mögliche biotechnologische Anwendung ein His₆-*tag* am C-Terminus insertiert (Tziridis, 2008). Mit dem His₆-*tag* ist eine Reinigung über eine immobilisierte Metallchelat-Affinitätschromatographie (IMAC) möglich. Bei dieser Art von Affinitätschromatographie interagiert das zu reinigende Protein spezifisch und reversibel mit an der Säule immobilisierten Metallionen. Im Fall von His₆-*tags* interagiert das Zielprotein mit Ni²⁺-Ionen, welche an das Säulenmaterial gebunden sind und koordinativ durch Histidinreste von Proteinen gebunden werden können.

Die Affinitätschromatographie von EK-Trypsinogen erfolgte mittels 5 ml HisTrap HP-Säule (GE Healthcare, München) an einer *fast protein liquid chromatography*-Anlage (Äkta-FPLC, UPC-900, Amersham Biosciences, Freiburg). Wie bereits für EK-Trypsinogen bekannt (Tziridis, 2008), tritt bei Arbeiten im neutralen bzw. basischen pH-Bereich eine Selbstaktivierung des Zymogens zur aktiven Form auf. Dadurch ist es erforderlich, dass bei der Reinigung von EK-Trypsinogen ausschließlich im sauren pH-Bereich gearbeitet wird. EK-Trypsinogen wurde mit dem Laufpuffer A (0,1 M Na-Acetat, 300 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, pH 4.0) auf die Säule gepumpt und anschließend mit einen Stufengradienten des Laufpuffers B (0,1 M Na-Acetat, 300 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, 500 mM Imidazol, pH 4.0) eluiert. Für Untersuchungen, die mit dem Zymogen durchgeführt werden sollten, wurde das gereinigte EK-Trypsinogen im Anschluss zwei Mal gegen 1 l Trypsin-Lagerlösung (1 mM HCl, 10 mM CaCl₂) dialysiert.

Wie oben bereits erwähnt, kann sich das aktive EK-Trypsin aus dem zymogenen EK-Trypsinogen ohne zusätzliche Zugabe von Enteropeptidase, dem eigentlichen Aktivator von Trypsinogen, selbst aktivieren. Zur Selbstaktivierung wurde EK-Trypsinogen einen pH-s*hift* unterzogen. Dazu wurde das Protein bei 4 °C gegen 50 mM Tris-Acetat, 300 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, pH 6,5 dialysiert und für 2 h bei 25 °C inkubiert.

2.3.5 Reinigung von EK-Trypsin mittels Gelfiltration

Die Gelfiltration oder Größenausschlusschromatographie beruht auf der Verteilung von Proteinen zwischen den Gelkompartimenten und den umgebenden Medium aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe. Während Proteine, die größer als die Poren sind, nicht ins Gelinnere gelangen können, durchdringen kleine Proteine einen mehr oder weniger großen Teil des Gels, d. h. dass größere Proteine als erstes eluieren, wohingegen kleine Proteine und Peptide länger auf der Säule verweilen, was zu einer späteren Elution führt.

Um das abgespaltene N-terminale Aktivierungspeptid vom reifen aktiven EK-Trypsin abzutrennen, wurde im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) durchgeführt. Für die Gelfiltration von EK-Trypsin wurde eine Superdex75 HiLoad16/60 Säule (GE Healthcare, München) verwendet. Die Reinigung wurde ebenso an einer *fast protein liquid chromatography*-Anlage bei einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹ in 50 mM Tris-Acetat, 300 mM NaCl, 20 mM CaCl₂, pH 6,5 durchgeführt. Anschließend wurde das gereinigte EK-Trypsin für die Lagerung zwei Mal gegen 1 l Trypsin-Lagerlösung (2.3.4) dialysiert.

2.4 Genexpression und Reinigung der Eglin C-Varianten, von Trypsiligase und von YRH-Ecotin

2.4.1 Genexpression von Eglin C

Die Plasmid-DNA der entsprechenden Eglin C-Varianten wurden in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert und eine Vorkultur, wie unter 2.3.1 beschrieben, angezogen. Die Hauptkultur (4 × 1,25 l LB-Medium, 100 μg ml⁻¹ Ampicillin) wurde in einen Volumenverhältnis von 1:250 mit der Vorkultur angeimpft. Die Zellen wurden bei 37 °C und 150 rpm (2.3.1) bis zu einer OD₆₀₀ von 1 kultiviert und anschließend die Genexpression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Um lösliches Protein zu erhalten, wurde die Temperatur, wie bereits von Menzel (2009) beschrieben, vor der Induktion mit IPTG auf 30 °C reduziert. Die Zellen wurden für die Genexpression weitere 4 h kultiviert und danach wie unter 2.3.1 beschrieben geerntet.

2.4.2 Zellaufschluss von Eglin C

Pro Gramm geernteter Zellen wurden 4 ml Aufschlusspuffer (25 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, pH 7,4) zugegeben. Die Resuspendierung fand am Ultraturrax statt. Im Anschluss wurden 1,5 mg Lysozym (2.1.5) pro Gramm Zellen zugegeben und die Suspensionslösung für 30 min auf Eis inkubiert. Nach dem Inkubationsschritt erfolgte der Zellaufschluss wie bereits unter 2.3.2 beschrieben mittels Hochdruckdispersion. Da Eglin C löslich in den $E.\ coli$ -Zellen exprimiert wird, befand sich das Protein nach Zentrifugation (4 °C, 30 min, $108.000 \times g$), welche zur Abtrennung von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen diente, im Überstand und konnte direkt zur anschließenden Reinigung eingesetzt werden.

2.4.3 Reinigung von Eglin C mittels Affinitätschromatographie

Die exprimierten Eglin C-Varianten besitzen durch die Klonierung in den Vektor pET-15b HisTEV-Prot einen N-terminalen His₆-tag, so dass das Zielprotein ebenfalls über die in 2.3.4 beschriebene Interaktion gereinigt werden konnte. Dazu wurde die Proteinlösung mit Laufpuffer A (25 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 7,4) auf eine

5 ml HisTrap FF-Säule (GE Healthcare, München) gepumpt und anschließend das Zielprotein mit einem Stufengradienten des Laufpuffers B (25 mM Natriumphosphat, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4) von der Säule eluiert.

Da im Vektor pET-15b HisTEV-Prot ebenso die Spaltsequenz für die tobacco etch virus (TEV)-Protease (van den Berg et al., 2006) codiert ist, kann der N-terminale His6-tag vom den Eglin C-Varianten abgespaltet werden. Damit die TEV-Protease hydrolytisch aktiv ist, müssen die gereinigten Eglin C-Varianten in reduzierenden Milieu vorliegen (Nallamsetty et al., 2004). Es erfolgte die zweimalige Dialyse der Eglin C-Varianten gegen 21 25 mM Natriumphosphat, 250 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7,4. Anfallende Aggregate wurden durch Zentrifugation (4 °C, 15 min, $108.000 \times g$) entfernt und anschließend wurde die Konzentration der Eglin C-Varianten nach 2.5.1 bestimmt. Die Zugabe der TEV-Protease erfolgte in einem molaren Verhältnis von 1:100 zu den Eglin C-Varianten. Danach wurde der Spaltungsansatz für 16 h bei 25 °C unter ständigem Schütteln (600 rpm) inkubiert. Um das Reduktionsmittel DTT aus dem Ansatz zu entfernen, wurde der Reaktionsansatz zwei Mal gegen 2 l Laufpuffer A dialysiert und anschließend anfallende Aggregate durch Zentrifugation (4 °C, 15 min, 108.000 × g) abgetrennt. Danach wurden die Eglin C-Varianten mittels Laufpuffer A auf eine 5 ml HisTrap HP-Säule aufgetragen. Da das Zielprotein nun keinen His₆-tag mehr enthält, kann es auch nicht mehr die Ni²⁺-Ionen der Säule komplexieren und befindet sich im Durchfluss. Mit diesem Reinigungsschritt erfolgt die Abtrennung des His₆-tag-freien Zielproteins von ungeschnittenen-Zielprotein und der TEV-Protease, welche ebenfalls einen His6-tag trägt und somit an der Säule bindet. Zur Lagerung wurden die gereinigten und His6-tag-freien Eglin C-Varianten zwei Mal gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,8 dialysiert und bei -20 °C gelagert.

2.4.4 Genexpression und Reinigung von r-Trypsiligase, b-Trypsiligase und YRH-Ecotin

Die Genexpression sowie die Reinigung und biophysikalische Charakterisierung von r-Trypsiligase (*rat*-Trypsiligase) und b-Trypsiligase (*bovine*-Trypsiligase) (1.6.2) fand in den Laboren der Abteilung Naturstoffbiochemie (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Frank Bordusa, MLU, Institut für Biocheimie/Biotechnologie) durch Diplom-Biochemikerin Ariunkhur Sharkhuukhen statt. Dabei wurden r-Trypsiligase (Liebscher, 2007) und b-Trypsiligase (Sharkhuukhen, 2009) nach etablierten Protokollen präpariert.

Das Ecotin-Gen konnte von Dipl.-Biochem. A. Sharkhuukhen aus *E. coli* JM110-Zellen amplifiziert und in den pET-21a Vektor kloniert werden. Anschließend wurde durch ortsgerichtete Mutagenese die Generierung der Ecotin-Variante M84Y/M85R/A86H (YRH-Ecotin) durchgeführt (unveröffentlichte Daten von A. Sharkhuukhen). Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen, wobei nach der Induktion mit einer Endkonzentration von 0,5 mM IPTG die Überexpression bei 16 °C über 16 h erfolgte. Der Periplasmaaufschluss und die Reinigungsschritte erfolgten durch die bereits aus der Literatur für Wildtyp-Ecotin bekannten Protokolle (Chung *et al.*, 1983; Yang *et al.*, 1998).

So lag neben den Enzymen r-Trypsiligase und b-Trypsiligase auch der Inhibitor YRH-Ecotin in 50 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, pH 7,8 in reiner Form zur Kristallisation und für Interaktionsstudien vor.

2.5 Biophysikalische Charakterisierung

2.5.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Moleküle, die aromatische Ringsysteme enthalten, absorbieren durch die Anregung der π -Elektronensysteme Licht im Wellenlängebereich zwischen 260 - 280 nm. Bei Proteinen geschieht dies vor allem durch die aromatischen Aminosäuren Trp und Tyr, von denen die Extinktionskoeffizienten ε ermittelt werden können (Pace *et al.*, 1995). Somit ist der Extinktionskoeffizient und damit verbunden die Absorption eines Proteins maßgeblich von seiner Aminosäurezusammensetzung abhängig (Gill und von Hippel, 1989) und kann nach (Gasteiger *et al.*, 2005) (http://web.expasy.org/protparam/) berechnet werden. Durch Umstellen des *Lambert-Beer'schen* Gesetzes $E = \varepsilon \cdot c \cdot d$ kann die Proteinkonzentration der Lösung bestimmt werden. Der spezifische Extinktionskoeffizient $\varepsilon_{280nm}^{0.196}$ in ml mg⁻¹ cm⁻¹ unter oxidierten Bedingungen ist in der Tabelle 2.1 für die jeweiligen Proteine oder Protein-Varianten aufgeführt. Die Absorption der verschiedenen Proben wurde bei 280 nm in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm an einem Spektrophotometer (Ultrospec 3300Pro, Amersham Pharmacia, Freiburg) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde, wie oben bereits erwähnt, nach folgender Formel in mg ml⁻¹ berechnet:

$$c = \frac{E}{\varepsilon \cdot d}$$
 (Gleichung 2.1)

Tabelle 2.1: Berechnete Extinktionskoeffizienten der verschiedenen Proteine.

Protein / Protein-Variante	${\cal E}_{280nm}^{0,1\%}$ in ml mg $^{ extsf{-}1}$ cm $^{ extsf{-}1}$
EK-Trypsinogen	1,439
EK-Trypsin	1,551
L45K-Eglin C	1,088
L45A/L47H-Eglin C	1,092
L45Y/L47H-Eglin C	1,260
r-Trypsiligase	1,454
b-Trypsiligase	1,551

2.5.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) trennt die zu untersuchenden Proteine im Polyacrylamidgel durch ein elektrisches Feld nach ihrer Größe auf. Das anionische Detergenz SDS, welches bei Hitzeeinwirkung an denaturierte Proteine bindet, neutralisiert alle vorhandenen Ladungen der Proteine. Folglich sind alle Proteine negativ geladen und weisen ein gleiches Ladungs-Masse-Verhältnis auf, so dass die elektrophoretische Auftrennung nur von der molaren Masse der Proteine abhängig ist.

Die zu untersuchenden Proteinproben wurden im Verhältnis 2:1 mit 3-fach SDS-PAGE-Probenpuffer [200 mM Tris-HCl, 200 mM DTT, 20% (v/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 0,0125% (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8] versetzt und bei 95 °C für 5 min denaturiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurden zwei verschiedene Puffersysteme [Tris-Gele nach Laemmli (1970) und Tris-Tricin-Gele nach Schägger und von Jagow (1987)] verwendet. Bei der Methode nach Laemmli erfolgte die gelelektrophoretische Trennung der Proteine für 70 min bei 25 mA an einer Eletrophorese-Apparatur (Elektrophorese Power Supply EPS 300, Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz). Bei den Tris-Tricin-Gelen (Schägger und von Jagow, 1987), welche sich besonders zur Analyse von niedermolekularen Proteinen eignen (z. B. für Eglin C und vor allem zur Komplexbildung der Eglin C-Varianten mit den Trypsiligase-Varianten), erfolgte die Auftrennung für 150 min bei 25 mA.

Die Detektion der Proteinbanden in den SDS-PAGE-Gelen erfolgte durch Silber-Färbung (Nesterenko *et al.*, 1994) oder mittels Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (Färbelösung: 0,05% (w/v) Brilliant-Blau R 250, 25% (w/v) Isopropanol, 10% (w/v) Essigsäure; Entfärbungslösung: 10% (w/v) Essigsäure).

2.5.3 Massenspektrometrie

Die Proben wurden mittels ZipTip-C₄ Pipettenspitzen (Merck Millipore, Darmstadt) entsalzt, die Elution erfolgte dabei mit 80% (v/v) ACN, 0,1% (v/v) TFA oder mit 70% Ameisensäure. Die Massenspektren wurden freundlicherweise von Frau Dr. Angelika Schierhorn von der Max-Planck-Forschungsstelle für Enzymologie und Proteinfaltung Halle erstellt und ausgewertet. Dabei wurden Elektrospray-Ionisations-Massenspektren (ESI-MS) an einem Esquire-LC-Ionenfallen Massenspektrometer (Bruker Analytik, Bremen) und *Matrix-assisted laser desorption/ionization - time of flight* (MALDI-TOF)-Massenspektren an einem REFLEX-Spektrometer (Bruker Analytik) aufgenommen.

2.6 Aktivitätsbestimmung von EK-Trypsin

2.6.1 Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen

Das gereinigte EK-Trypsinogen (2.3.4) wurde in Trypsin-Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 8,0) überführt, so dass es eine Konzentration von 0,2 mg ml⁻¹ besaß, und bei 37 °C inkubiert. Nach bestimmten Zeitpunkten wurden dem Ansatz 10 μl-Aliquote entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 10 μl 50 mM Phenylmethanesulfonylfluorid (PMSF), gelöst in Isopropanol, gestoppt. Die Proben wurden an einem Vakuum-Evaporator (Jouan RC10.10, MedServ GmbH, Leipzig) getrocknet und anschließend mit SDS-PAGE-Probenpuffer (2.5.2) versetzt. Da bei der Aktivierung von EK-Trypsinogen zu EK-Trypsin das Aktivierungspeptid mit dem sich N-terminal davon befindlichen His₆-tag (HHHHHHHFPVDDDDK, MW: 1773 Da) abgespalten wird, kann die Aktivierung durch eine SDS-PAGE (2.5.2) mit Tris-Gelen nach Laemmli (Trenngel 12% Acrylamid, Sammelgel 6,5% Acrylamid) analysiert werden.

2.6.2 Aktivitätsbestimmung mit Trypsinogen als Substrat

Um zu analysieren, ob EK-Trypsin eine Aktivität gegenüber Trypsinogen und somit eine Affinität gegenüber der darin enthaltenen Spaltsequenz -DDDDK- besitzt, wurde Trypsinogen mit EK-Trypsin inkubiert und die Aktivität des entstandenen Trypsins gegenüber dem Substrat CH_3SO_2 -DHHT-Gly-Arg-pNA pAcOH (Pefachrome tPA, 2.1.5) gemessen. Trypsin besitzt gegenüber Pefachrome tPA einen K_M -Wert von 23 μ M (Rauh *et al.*, 2002). Die

Änderung der Absorption des nach der Spaltung entstandenen Nitroanilins kann spektroskopisch bei 405 nm (ε = 9900 M⁻¹ cm⁻¹, Lottenberg und Jackson, 1983) gemessen werden. Als Positivkontrolle für die Aktivierung von Trypsinogen wurden die Messungen ebenfalls in Gegenwart von Enteropeptidase anstatt EK-Trypsin durchgeführt. Da Trypsin, das Produkt der Spaltung, auch Trypsinogen aktivieren kann (Maroux *et al.*, 1971), wurde als Negativkontrolle die Messungen zur Aktivierung von Trypsinogen in Gegenwart von Trypsin anstelle von EK-Trypsin durchgeführt. Da sich Trypsinogen auch durch Autolyse selbst aktiviert (Davie und Neurath, 1955), wurde die Aktivität der Autolyse von Trypsinogen zu Trypsin ohne Zugabe einer weiteren Protease als weitere Referenz bestimmt.

Trypsinogen (2.1.5) wurde in Trypsin-Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 8,0) gelöst, so dass die finale Trypsinogen-Konzentration bei 0,2 mg ml⁻¹ (8,3 μ M) lag. Anschließend wurden die Trypsinogen-Lösungen mit EK-Trypsin bzw. Enteropeptidase bzw. Trypsin mit einer jeweiligen molaren Konzentration von 40 nM im Ansatz versetzt (Zeitpunkt t = 0). Der Ansatz wurde bei 37 °C inkubiert. Nach entsprechenden Zeitintervallen wurden dem Reaktionsansatz 2 μ l-Aliquote entnommen und zu 198 μ l Pefachrome tPA-Lösung (400 μ M Pefachrome tPA in Trypsin-Reaktionspuffer) gegeben. Die Änderung der Absorption bei 405 nm wurde an einen Spektrophotometer (2.5.1) als Funktion der Zeit gemessen. Für die Messungen wurde eine 1 cm-Quarzküvette verwendet.

Mit den im linearen Bereich der Messung ermittelten Anstiegen (ΔE) in min⁻¹ kann die Aktivität des bei der Spaltung entstandenen Trypsins über das *Lambert-Beer'sche* Gesetz (Gleichung 2.1) in μ mol min⁻¹ ml⁻¹ (U ml⁻¹) nach folgender Formel berechnet werden:

$$A_V = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d}$$
 (Gleichung 2.2)

wobei der Extinktionskoeffizient in mM^{-1} cm⁻¹ und die Schichtdicke in cm in die Gleichung einfließen. Die spezifische Aktivität (A_S) in μ mol min⁻¹ mg⁻¹ (U mg⁻¹) wurde durch den Bezug auf die Proteinkonzentration (c) in mg ml⁻¹ berechnet:

$$A_S = \frac{A_V}{C}$$
 (Gleichung 2.3)

Durch Einfügen der Gleichung 2.2 in Gleichung 2.3 erhält man den direkten Zusammenhang der spezifischen Aktivität und der gemessenen Absorptionsänderung (ΔE):

$$A_S = \frac{\Delta E}{\varepsilon \cdot d \cdot c}$$
 (Gleichung 2.4)

Da Pefachrome tPA den zum Trypsinogen-Ansatz zugesetzten Proteasen (EK-Trypsin, Enteropeptidase und Trypsin) ebenfalls als Substrat dient bzw. dienen könnte, wurden Ansätze mit 40 nM der entsprechenden Protease in Trypsin-Reaktionspuffer ohne Trypsinogen bei 37 °C inkubiert. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden 2 μl entnommen und wie oben beschrieben die Änderung der Absorption gegen die Zeit gemessen. Diese Hintergrundaktivität der Proteasen wurde von den entsprechenden Messungen mit Trypsinogen im Ansatz subtrahiert. Um die Aktivität des aktivierten Trypsinogens mit der des vollständig aktiven Trypsins vergleichen zu können, wurde Trypsin (2.1.5) in Trypsin-Reaktionspuffer mit einer Endkonzentration von 0,2 mg ml⁻¹ gelöst und die Aktivität gegenüber Pefachrome tPA, wie oben für Trypsinogen beschrieben, bestimmt.

2.6.3 Aktivitätsbestimmung mit DDDDK-RNase A als Substrat

Als weiteres Substrat für die Aktivität von EK-Trypsin sollte die RNase A-Variante DDDDK-RNase A, bei welcher eine artifizielle Enteropeptidase-Erkennungssequenz zwischen Ala20 und Ser21 insertiert worden war (Watkins *et al.*, 2011), untersucht werden. Die DDDDK-RNase A wurde freundlicherweise von PD Dr. Ulrich Arnold (Abteilung Technische Enzymologie, MLU, Institut für Biochemie/Biotechnologie) für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

DDDDK-RNase A wurde zwei Mal gegen 11 Trypsin-Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl, 154 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 8,0) dialysiert und anschließend mit einer Konzentration von 0,2 mg ml⁻¹ (14 µM) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Protease (EK-Trypsin bzw. Enteropeptidase) mit 80 nM im Ansatz zugesetzt. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden dem Ansatz 10 µl-Aliquote entnommen und die Reaktion mit 10 µl 25 mM PMSF gestoppt. Die Proben wurden wie unter 2.6.1 beschrieben behandelt und die Analyse erfolgte mit SDS-PAGE-Gelen nach Laemmli (Trenngel 18% Acrylamid, Sammelgel 6,5% Acrylamid).

Um zu überprüfen, ob Trypsin proteolytische Aktivität gegenüber DDDDK-RNase A besitzt, wurden Analysen mit Trypsin anstelle von EK-Trypsin bzw. Enteropeptidase wie oben beschrieben durchgeführt. Diese Charakterisierung ist möglich, da Trypsin Wildtyp-RNase A bei Temperaturen unter 45 °C praktisch nicht hydrolytisch spalten kann (Arnold *et al.*, 1996).

Somit ist eine mögliche Hydrolyse von DDDDK-RNase A nur durch die insertierte Sequenz erklärbar. Bei den SDS-PAGE-Analysen von EK-Trypsin mit den entsprechenden Substraten wurde ein selbst gemischter Molekulargewichtsstandard mitgeführt, welcher neben Trypsinogen (MW: 24,0 kDa) auch Sojabohnen-Trypsininhibitor (MW: 21,5 kDa) und Lysozym (MW: 14,4 kDa) beinhaltet.

2.6.4 Aktivitätsbestimmung mit DDDDK-RNase S als Substrat

Aus den Untersuchungen mit Enteropeptidase (2.6.3) konnte aus DDDDK-RNase A das Produkt DDDDK-RNase S generiert werden. Dazu wurde DDDDK-RNase A (0,2 mg ml⁻¹, 14 μM) wie unter 2.6.3 beschrieben für 1 h mit 80 nM Enteropeptidase inkubiert. Anschließend wurde der Proteinlösung EK-Trypsin (80 nM im Ansatz) zugesetzt. Zu entsprechenden Zeitpunkten wurden dem Ansatz 10 μl-Aliquote entnommen und die Reaktion wie unter 2.6.3 beschrieben gestoppt. Die anschließende Behandlung der Proben und die qualitative Detektion erfolgten ebenso wie unter 2.6.3 erläutert.

Als Positivkontrolle für die Spaltung von DDDDK-RNase S wurden Ansätze mit Trypsin angesetzt. Die Durchführung und Analyse erfolgte wie oben beschrieben, außer dass den Ansätzen anstelle von 80 nM EK-Trypsin nun 80 nM Trypsin zugesetzt wurden.

2.7 Interaktionsstudien

2.7.1 Gelfiltration

Um zu analysieren, ob die Eglin C-Varianten mit den Trypsiligase-Varianten interagieren, wurde die Gelfitration in Gegenwart beider Proteine durchgeführt. Die Proteine, bei denen eine mögliche Interaktion untersucht werden sollte (Trypsiligase-Variante und die jeweilige Eglin C-Variante), wurden zwei Mal gegen 2 1 50 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 µM ZnCl₂, pH 7,8 dialysiert. Danach wurde die jeweilige Trypsiligase-Variante mit einem zehnfachen molaren Überschuss der entsprechenden Eglin C-Variante gemischt und für 1 h auf Eis inkubiert. Die Proteinlösung wurde mittels einer Superdex75 HiLoad26/60 Säule (GE Healthcare) gekoppelt an eine *fast protein liquid chromatography*-Anlage analysiert. Die Elution erfolgte bei einer konstanten Flussrate von 1 ml min⁻¹.

2.7.2 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Assoziation von Proteinen ist charakterisiert durch die Stöchiometrie (N), die Assoziationskonstante (K_A), die freie Energie (ΔG°), die Enthalpie (ΔH_B) und die Entropie (ΔS_B) der Bindung (Pierce *et al.*, 1999). Die Bildung von Protein-Protein Komplexen geht in den meisten Fällen mit einer Reduzierung der Wärmekapazität (ΔC_p) einher (Pierce *et al.*, 1999). Diese Reduzierung korreliert mit der Verringerung der Zugänglichkeit nicht-polarer Regionen an der Oberfläche der Bindepartner im Komplex. Die Änderung der Wärmemenge, die bei der Assoziation eines Liganden an seinen Bindepartner auftritt, kann durch ITC bestimmt werden.

Das ITC-Gerät beinhaltet zwei separate Zellen, die Proben- und die Referenzzelle. Die Zellen sind von einem adiabatischen Schutzschild umgeben, welcher den Wärmeaustausch mit der Umgebung verhindert. Der ausführliche Aufbau von Kompensationskalorimetern ist in der Literatur weitreichend beschrieben (Wiseman et al., 1989; Cooper, 1999). Der Referenzzelle, die Wasser oder Puffer enthält, wird während der Messung eine konstante Energie (< 1 mW) zugeführt, welche eine feedback Zirkulation zu den Heizelementen in der Probenzelle leitet, dies stellt das Basisliniensignal dar. Beim Zutropfen der Ligandenlösung zum Protein in der Messzelle kann durch die Interaktion beider Moleküle Wärme frei werden, die Reaktion ist dann exotherm. Die Probenzelle muss in dem Fall im Vergleich zur Referenzzelle weniger geheizt werden. Der andere Fall tritt ein, wenn bei der Wechselwirkung zwischen den Proteinen Wärme verbraucht wird (endotherme Reaktion), dann muss die Probenzelle stärker geheizt werden als die Referenzzelle. Das eigentliche Messsignal ist somit die zeitabhängige Zufuhr von Energie durch die Heizelemente der Probenzelle, die benötigt wird, die gleiche Temperatur wie in der Referenzzelle aufrechtzuerhalten. Trypsin besitzt nur eine Bindestelle für Liganden (Substrate, Inhibioren), so dass die Interaktion eine bimolekulare Reaktion darstellt:

$$P + L \rightarrow PL$$
 (Gleichung 2.5)

Der Massenwirkungsbruch (Q) dieser Reaktion hat dann folgende Form:

$$Q = \frac{[PL]}{[P] \cdot [L]}$$
 (Gleichung 2.6)

Die Gibbs-Energie ist definiert durch:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + R \cdot T \cdot \ln Q \qquad (Gleichung 2.7)$$

wobei ΔG die Änderung der Gibbs-Energie, ΔG^o wie oben bereits erwähnt, die Gibbs'sche Enthalpie darstellen. R ist die universelle Gaskonstante und T die absolute Temperatur. Da sich die Reaktion im thermodynamischen Gleichgewicht befindet, ergibt sich für $\Delta G = 0$ und der Massenwirkungsbruch (Gleichung 2.6) kann der Assoziationsgleichgewichtskonstante K_A gleichgesetzt werden:

$$\Delta G^o = -R \cdot T \cdot \ln K_A \qquad (Gleichung 2.8)$$

Durch den Masseerhaltungssatz und der Gleichstellung von K_A mit Q wird aus Gleichung 2.6:

$$K_A = \frac{[PL]}{([P]_0 - [PL]) \cdot ([L]_0 - [PL])}$$
 (Gleichung 2.9)

die sich nach der Konzentration des gebildeten Protein-Ligand Komplexes [PL] auflösen lässt:

$$[PL] = \frac{1}{2}([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_A}) - \sqrt{\frac{([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_A})^2}{4} - [P]_0[L]_0}$$
 (Gleichung 2.10)

In Abhängigkeit von der Änderung der Gesamtkonzentration des zugegebenen Liganden $\Delta[L]_0$ ergibt sich für die freie Komplexkonzentration $\Delta[PL]$ folgende Änderung:

$$\frac{\Delta[PL]}{\Delta[L]_0} = \frac{1}{2} - \frac{\left(\frac{1}{K_A} + [L]_0 - [P]_0\right)}{\sqrt{\frac{\left([P]_0 + [L]_0 + \frac{1}{K_A}\right)^2}{4} - [P]_0[L]_0}}$$
(Gleichung 2.11)

Die Wärme Δq , die bei der Zugabe des Liganden entsteht, kann durch folgende Gleichung dargestellt werden:

$$\Delta q = \Delta H_B \left(\frac{\Delta [PL]}{\Delta [L]_o} \right)_{[P]_o, [L]_o} \cdot \Delta [L]_o V$$
 (Gleichung 2.12)

wobei ΔH_B die Bindungsenthalpie der zu untersuchenden Reaktion und V das Reaktionsvolumen angeben.

Mit den Gleichungen 2.11 und 2.12 können die Assoziationskonstante K_A und die Bindungsenthalpie ΔH_B bestimmt werden. Eine ausführliche Erläuterung der Herleitung und der Auswertung der Gleichungssysteme lieferte Indyk 1998 (Indyk und Fisher, 1998).

Die ITC-Messungen zu der Interaktion zwischen den Trypsiligase-Varianten und den entsprechenden Eglin C-Varianten wurden einem VP-ITC an Mikrokalorimeter (MicroCal LLC, Freiburg) durchgeführt. Dazu wurden die Proteinlösungen zwei Mal gegen 21 ITC-Puffer (50 mM HEPES-NaOH, 125 mM NaCl, 1 mM CaCl₂, pH 7,8) dialysiert. Da die Trypsiligase-Varianten eine artifizielle Zink-Bindestelle besitzen (Liebscher, 2007), wurden ebenfalls Messungen in Gegenwart von Zn²⁺-Ionen durchgeführt, um zu garantieren, dass die Metallbindestelle abgesättigt ist. Bei diesen ITC-Messungen enthielt der ITC-Puffer zusätzlich 100 μM ZnCl₂. Nach der Dialyse wurden anfallende Aggregate mittels Zentrifugation (20800 × g, 4 °C, 15 min) abgetrennt und die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach 2.5.1. Die Konzentration für die Trypsiligase-Varianten wurden für die ITC-Messungen auf 10 - 17 μM eingestellt, die Konzentration für die Eglin C-Varianten zehnfach höher (100 - 170 μM). Alle ITC-Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Die Proteinlösungen wurden am Gerät entgast und auf 25 °C vortemperiert. Anschließend wurden 1,4 ml der Trypsin-Lösung in die Probenzelle pipettiert und 290 µl der Eglin C-Lösung in die Ligandenspritze aufgezogen. Bei den Messungen wurden 29 Einzelinjektionen zu je 10 µl des Liganden durchgeführt. Zwischen den einzelnen Injektionen wurden 420 s Abstand gelassen, damit sich das Gleichgewicht zwischen den Bindepartnern einstellen kann und das Signal auf die Basislinie zurückkehren kann. Um Aggregationen der Trypsin- oder Eglin C-Lösung zu vermeiden und die Scherkräfte so gering wie möglich zu halten, wurde eine Rührgeschwindigkeit der Ligandenspritze von 155 rpm eingestellt.

Da ITC-Messungen anfällig gegenüber Konzentrationsunterschieden in den Puffersubstanzen und damit verbunden für Unterschiede im pH-Wert sind und des Weiterem die Verdünnungseffekte der Proteine ebenfalls eine Wärmeänderung hervorrufen können, wurden

Referenzmessungen nur mit dem Liganden (Eglin C) durchgeführt. Hierzu wurden die Proben wie oben beschrieben vorbereitet, wobei nun anstelle der Trypsin-Lösung der entsprechende ITC-Puffer in die Probenzelle pipettiert wurde. In der Ligandenspritze befand sich wiederum die Eglin C-Lösung. Die Einstellungen wurden im Vergleich zur Messung mit beiden Bindepartnern nicht verändert.

Mit Hilfe des Programms Origin 7.0 (MicroCal LLC) konnten die erhaltenen Messdaten ausgewertet und die thermodynamischen Parameter der Bindung ermittelt werden. Dabei wurde den Daten ein 1:1 Bindungsmodell zugrunde gelegt, wobei die Bindungsart über unabhängige Bindestellen verläuft (*one set of sites*). Ebenfalls konnte im Programm die Referenzmessung von der Messung mit beiden potentiellen Bindepartnern subtrahiert werden.

2.7.3 Analytische Ultrazentrifugation

Durch die analytische Ultrazentrifugation kann die molare Masse von Makromolekülen in bestimmt bzw. Rückschlüsse auf das Oligomerisierungsverhalten Makromoleküls unter bestimmten Bedingungen gezogen werden. Mit der analytischen Ultrazentrifugation können zwei Arten von Experimenten durchgeführt werden, erstens kann Sedimentationsgeschwindigkeit bestimmt werden und zweitens die kann das Sedimentationsgleichgewicht ermittelt werden. Bei Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen wird bei hoher Zentrifugalkraft (hohe Geschwindigkeit des Rotors) gearbeitet und aus den Messungen kann der Sedimentationskoeffizient ermittelt werden. Bei Sedimentationsgleichgewichtsexperimenten wird die mit niedrigeren Lösung Geschwindigkeiten des Rotors zentrifugiert. Dabei kommt es zu einer exponentiellen Verteilung des Proteins in der Messzelle, welche abhängig vom molaren Masse ist. Somit kann aus der gemessenen Verteilung des Proteins die molare Masse berechnet werden. Den Zusammenhang und die Berechnung der entsprechenden Parameter in Abhängigkeit von den durchgeführten Experimenten am Beispiel von Chromatin lieferte (Ausio, 2000), wobei die Theorie der analytischen Ultrazentrifugation von Theodor Svedberg stammt (Svedberg, 1934).

Um zu überprüfen, in welchem oligomeren Zustand r-Trypsiligase in Lösung vorliegt, wurden Sedimentationsgleichgewichtsläufe zur Bestimmung der molaren Masse durchgeführt. Die r-Trypsiligase wurde mit einer Konzentration von 0,2 mg ml⁻¹ (8,4 μM) gegen 1 l 50 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 0,7 mM CaCl₂, 100 μM ZnCl₂, pH 7,8 dialysiert. Als Kontrollexperiment für den monomeren Zustand wurde r-Trypsiligase mit einer

Konzentration von 0,2 mg ml⁻¹ (8,4 μM) gegen 1 l 50 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 0,7 mM CaCl₂, 0,5 mM EDTA pH 7,8 dialysiert. EDTA als Komplexbildner besitzt eine höhere Affinität zu Zn²⁺-Ionen gegenüber Ca²⁺-Ionen (Chaberek und Martell, 1955), so dass das an der Metallbindestelle befindliche Zink abgetrennt und von EDTA komplexiert werden kann. Durch diese Pufferzusätze, bei denen das Ca²⁺-Ion weiterhin an seine Bindestelle gebunden ist, sollte r-Trypsiligase in Lösung nur als Monomer vorliegen, da eine Dimerisierung über gebundenes Zink nicht mehr möglich ist. Zusätzlich sollte der Komplex aus r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C als Kontrolle dienen, da im Komplex nur ein Trypsin-Monomer mit einem Eglin C-Monomer interagiert. Der Komplex wurde wie unter 2.7.1 beschrieben erhalten und auf eine Konzentration von 0,27 mg ml⁻¹ eingestellt, dies entsprach einer molaren Konzentration der im Komplex enthaltenen r-Trypsiligase von 8,4 μM.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_D) für das möglichen Monomer - Dimer Gleichgewicht wurden Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe durchgeführt. Dazu wurde r-Trypsiligase mit einer Konzentration von 2 mg ml⁻¹ gegen 50 mM HEPES-NaOH, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, 100 μ M ZnCl₂, pH 7,8 dialysiert und es wurde eine Verdünnungsreihe im Bereich von 0,05 - 1,5 mg ml⁻¹ angefertigt. Für die einzelnen Proteinkonzentrationen wurden die Sedimentationsgeschwindigkeiten und damit der Sedimentationskoeffizienten ermittelt. Durch das Auftragen der erhaltenen Sedimentationskoeffizienten gegen die Proteinkonzentration erhält man die Sättigungskurve, aus der dann K_D berechnet werden kann.

Die Zentrifugationsläufe sowie die Auswertung zur Bestimmung der molaren Massen bzw. der Sedimentationskoeffizienten wurden freundlicherweise von PD Dr. Hauke Lilie (Abteilung Technische Biochemie, MLU, Institut für Biochemie/Biotechnologie) an einer Analytischen Ultrazentrifuge (Optima XL-A, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) durchgeführt.

2.8 Kristallisation und Röntgenkristallstrukturanalyse

Die Kristallisation und anschließende Röntgenstrukturanalyse ist neben der *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie und der Elektronenmikroskopie eine wesentliche Methode, strukturellen Informationen im atomaren Bereich zu erhalten. Seit den fundamentalen Arbeiten von Perutz und Kendrew, der Strukturaufklärung des Myoglobins (Kendrew und Perutz, 1957), wächst die Anzahl der gelösten Strukturen seit Jahren exponentiell (Abbildung 2.1). Dies belegt, dass die Strukturaufklärung bedeutenden Einfluss auf die Forschung hat, da sie z. B. molekulare Einblicke in Reaktionsmechanismen liefert und zum Verständnis von Protein-Protein- oder Protein-Inhibitor-Interaktionen etc. beiträgt (Berman *et al.*, 2000; Berman *et al.*, 2002). Für die Pharmaindustrie ist die Strukturaufklärung von Interesse, da mit ihr gezielt Strategien zur Veränderungen von Wirkstoffe entwickelt werden können.

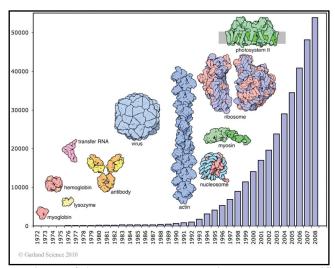


Abbildung 2.1: Wachstum der Proteindatenbank, modifiziert aus Rupp (2010).

2.8.1 Kristallisation von Proteinen

Die Voraussetzung für die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen ist das Vorhandensein von Proteinkristallen. Diese bilden sich, wenn sich Proteinmoleküle aus der Proteinlösung separieren und sich selbstständig in periodischen Kristallgittern aneinanderfügen. Die kleinste Einheit dieser periodischen Anordnung, die sich in alle drei Dimensionen ausbreitet, nennt man die Einheitszelle (*unit cell*). Diese besteht, wie in Abbildung 2.2 ersichtlich, aus dem Einheitsgitter, welches durch die drei Kantenlängen a, b und c und die drei Winkel α , β und γ gekennzeichnet ist, und dem Protein (Inhalt der Einheitszelle).

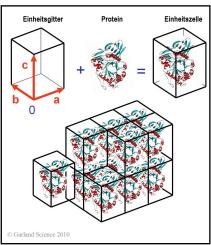


Abbildung 2.2: Anordnung der Einheitszellen im dreidimensionalen Proteinkristall, modifiziert aus Rupp (2010).

Um die Proteinmoleküle von der löslichen in die kristalline Form zu überführen, muss die Löslichkeit dieser herabgesetzt werden. Dies kann durch so genannte Fällungsmittel, auch Präzipitanzien genannt, geschehen. Dabei werden unter anderem Salze (McPherson, 2001) bzw. wasserentziehende Agenzien wie z.B. Polyethylenglycol (McPherson, 1976) oder Polyethylenglycolmonomethylether (Brzozowski und Tolley, 1994) verwendet. Wie in Abbildung 2.3 erkennbar, verschiebt sich die Löslichkeit von Proteinen (untersättigter Bereich) mit zunehmender Präzipitanskonzentration zu niedrigeren Proteinkonzentrationen hin. Ist durch steigende Präzipitanskonzentration die Löslichkeit der Proteine soweit herabgesetzt, dass sie die Löslichkeitsgrenze erreicht, gelangt die Proteinlösung in den metastabilen Bereich. Im metastabilen Bereich kann immer noch keine de novo-Kristallisation stattfinden, jedoch ist dies der Bereich, in dem bereits vorhandene Kristalle weiter wachsen können. Wenn nun die Löslichkeit weiter verringert wird, gelangt die Lösung in den übersättigten Bereich (labile Phase), in dem die Proteinmoleküle unter geeigneten Bedingungen Kristallisationskeime bilden können (Nukleation). Anschließend beginnt das Wachstum der Kristalle und der übersättigten Lösung werden Proteinmolekülen entzogen. Diese Proteinmoleküle lagern sich im Kristall zusammen, wodurch die Proteinkonzentration in der Lösung sinkt. Als Folge der Konzentrationsverringerung gelangt die Proteinlösung wieder in den metastabilen Bereich. Dort findet, wie oben bereits erwähnt, weiteres Kristallwachstum statt, bis die Proteinkonzentration in der Lösung an die Grenze zum untersättigten Bereich gelangt. Die Kristallisationsmethode, bei der man Proteinkristalle allein durch Zugabe der Präzipitanzien erhält, nennt man batch crystallization. Diese Methode führt aber nur in den wenigsten Fällen, wie z.B. für Lysozym aus dem Hühnerei (Forsythe et al., 1997), zur erfolgreichen Kristallisation, da die übersättigte Phase zu schnell erreicht wird und die Aggregation von Proteinen mit der Kristallisation konkurriert.

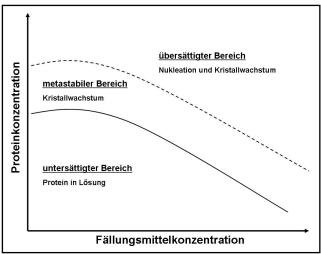


Abbildung 2.3: Löslichkeitsdiagramm einer Proteinlösung. Es sind die Proteinkonzentrationen gegen die Fällungsmittelkonzentrationen aufgetragen.

Aus Abbildung 2.3 wird ersichtlich, dass das Erreichen des übersättigten Bereiches auch durch eine Erhöhung der Proteinkonzentration stattfinden kann. Aus diesem Grund nutzt man neben dem Zusatz der Präzipitanzien auch Konzentrationsunterschiede dieser Präzipitanzien gegenüber der Umgebung aus. In der Reservoirlösung befindet sich das Präzipitans in einer höheren Konzentration als im Kristallisationstropfen. Durch die Konzentrationsunterschiede kommt es zu einer Diffusion von Wasser, das die Konzentrationsunterschiede ausgleicht. Da die Konzentration an Präzipitans im Reservoir höher ist, diffundiert das Wasser vom Kristallisationstropfen zum Reservoir und im Tropfen werden die Konzentrationen der Präzipitanzien und damit verbunden auch die Konzentration des Proteins erhöht. Dabei unterscheiden sich die verwendeten Methoden, die die Diffusion hervorrufen, voneinander. Die wohl meist genutzte Methode stellt die Dampfdiffusion (vapor diffusion) dar. Bei dieser unterscheidet man, je nach Lage des Kristallisationstropfens, zwischen hängenden Tropfen (hanging-drop vapor diffusion) oder sitzenden Tropfen (sitting-drop vapor diffusion). Die 2 Bilder und der Abbildung 2.4 zeigen die Versuchsanordnung Dampfdiffusionsvarianten. Voraussetzung der Dampfdiffusion ist ein geschlossenes System, bei dem der Puffer des Reservoirs (enthält die Puffer- und Präzipitanzienkomponenten) mit der Proteinlösung gemischt wird. Die Diffusion der Wassermoleküle erfolgt hierbei über die Gasphase, die sich zwischen Reservoir und Kristallisationstropfen befindet, wodurch ggf. die metastabile und übersättigte Phase erreicht werden. Eine weitere Methode der Kristallisation der *microbatch under oil*-Ansatz dar (Abbildung 2.4, Bild 3), bei dem der Kristallisationstropfen unter einer Schicht wasserdurchlässigen Öles platziert wird. Durch diese Ölschicht können Wassermoleküle evaporieren, was zu einer Erhöhung der Protein- und Präzipitanskonzentration führt (Brumshtein et al., 2008). Weitere Methoden sind die Mikrodialyse (Abbildung 2.4, Bild 4) oder die Kristallisation in einer Kapillare (Abbildung 2.4, Bild 5), wobei bei letzterer die Protein- und Präzipitanslösung an den verschiedenen Enden der Kapillare platziert werden und sich im Laufe der Diffusion ein Gleichgewicht entlang der Kapillare einstellt.

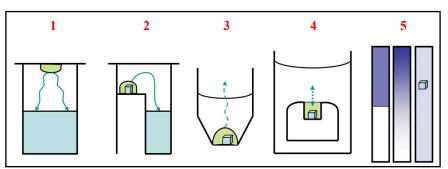


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Kristallisationstechniken modifiziert aus Rupp (2010).

1: Dampfdiffusion (hängender Tropfen), 2: Dampfdiffusion (sitzender Tropfen), 3: microbatch under oil,

4: Mikrodialyse, 5: Kristallisation in einer Kapillare.

Kristallisationsansätze im Nanoliter-Bereich haben sich als effektive screening-Methode etabliert (Santarsiero et al., 2002; DeLucas et al., 2003). Deshalb wurden die initialen Kristallisationsversuche, die im Laufe dieser Arbeit stattfanden, im 96-well-Maßstab durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden vor der Kristallisation mit einem Amicon® Ultra-Konzentrator (Milipore, Carringtwohill, Irland) mit einer Porenausschlussgröße von 3,5 kDa (Eglin C-Varianten) bzw. 10,0 kDa (Trypsiligase, Komplex aus Trypsiligase und YRH-Ecotin) an einer Eppendorf-Zentrifuge (Zentrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg) aufkonzentriert. Die Proteinlösungen, die anschließend eine Konzentration von 5 bzw. 10 mg ml⁻¹ aufwiesen, wurden an einem Pipettierroboter (Cartesian Zinsser-Analytik, Frankfurt/M.) mit den Lösungen vorhandener Kristallisationskits (2.1.4) gemischt. Dabei wurden 200 nl Proteinlösung mit 200 nl Reservoirlösung im sitting drop-Verfahren gemischt und anschließend wurden die Kristallisationsansätze bei einer Temperatur von 16 °C inkubiert (vapor diffusion). Die Aufnahme von Bildern, die den Kristallisationsverlauf dokumentieren, erfolgte mit einem automatisierten Imaging-System (Desktop Minstrel UV, Rigaku Europe, Kent, UK).

Bedingungen, bei denen im initialen *screening* Kristalle auftraten, wurden zu einem *fine-screening* verwendet. Dabei wurde die Kristallisation in 15- bzw. 24-*well*-Kristallisationsplatten (Qiagen, Hilden) im *hanging drop vapor diffusion*-Verfahren durchgeführt. Standardmäßig wurden die gleichen Proteinkonzentrationen verwendet wie im initialen 96-*well screening*. Die Kristallisationstropfen wurden nun per Hand aufgetragen und mit dem gleichen Volumen an Reservoirlösung versetzt, wobei das Volumen der

Kristallisationstropfen in diesen Ansätzen ein finales Volumen von 2 bzw. 4 μl aufwies. Weiterhin wurden im 15- bzw. 24-well-Maßstab *fine-screenings* durchgeführt, bei denen die Parameter der Kristallisation variiert wurden. In diesen Fall wurden Parameter wie die Proteinkonzentration, der pH-Wert der Präzipitanzienlösung, die Präzipitanzienkonzentration, die Pufferkonzentration oder die Konzentration von Additiven, die sich in den Präzipitanslösungen befanden, variiert. Zusätzlich wurden *fine-screening*-Experimente durchgeführt, bei der der Protein-Präzipitans-Mischung des Kristallisationstropfens spezielle niedermolekulare Additive zugesetzt wurden. Dazu wurde ein Kristallisations-Additiv-Kit (2.1.4) verwendet, nach dessen Anleitung dem Kristallisationstropfen 10% (v/v) des entsprechenden Additivs zugesetzt wurde.

Bei der Kristallisation von Komplexen, im Rahmen dieser Arbeit von der Protease und ihrem Inhibitor, musste der Komplex erst generiert und von unkomplexierten Bestandteilen abgetrennt werden. Dazu wurde r-Trypsiligase mit einem 10-fachen molaren Überschuss an der entsprechenden Eglin C-Variante bzw. b-Trypsiligase mit einem 2-fachen molaren Überschuss an YRH-Ecotin versetzt und für 1 h auf Eis inkubiert. Der Überschuss an Inhibitor sollte die vollständige Bindung der entsprechenden Trypsiligase gewährleisten, so dass sich für die darauffolgende Reinigung nur Komplex und freier Inhibitor in der Lösung befanden. Der Komplex wurde anschließend mittels Gelfiltration (siehe 2.7.1) mit Hilfe einer Superdex75 HiLoad26/60 Säule (GE Healthcare) vom freien Inhibitor abgetrennt. Der so erhaltene Komplex aus Trypsiligase und dem entsprechenden Inhibitor wurde wie die inhibitorfreien Enzyme aufkonzentriert und wie oben beschrieben zur Kristallisation im 96-well- und anschließend im 15- bzw. 24-well-Maßstab verwendet.

2.8.2 Vorbereitung, Röntgenbeugungsanalyse und Datensammlung

Die Grundlage der Röntgenkristallstrukturanalyse legte Wilhelm Conrad Röntgen im Jahre 1895 durch die Entdeckung der Röntgenstrahlen (*X-rays*) mit Hilfe einer Elektronenröhre. Max von Laue und das Vater-Sohn-Duo Sir W. Henry Bragg und Sir W. Lawrence Bragg fanden heraus, dass die Röntgenstrahlen elektromagnetische Wellen darstellen, die mit Materie interagieren können. Röntgenstrahlen sind elektromagnetische Strahlen mit einer Energie, die 10⁴-fach höher ist, als die Energie des sichtbaren Lichts.

Der grundlegende physikalische Prozess der Röntgenstrahlstreuung ist die Wechselwirkung des elektrischen Feldvektors (E) der fortlaufenden elektromagnetischen Welle (Röntgenphoton) mit Elektronen der Materie. Im Fall der Röntgenkristallstrukturanalyse

findet Wechselwirkung zwischen der elektromagnetischen die Strahlung, den Röntgenstrahlen, und den Elektronen der Atome im Proteinkristall statt. Bei der Streuung von Röntgenstrahlen durch Proteinkristalle handelt es sich um eine elastische Wechselwirkung von Röntgenphotonen (Welle) mit den Elektronen der Atome, bei der sich die Ausbreitungsrichtung des Röntgenphotons ändert. Diese Energie-abhängige Änderung tritt auf, wenn Röntgenstrahlen an den so genannten Absorptionskanten der Elemente im Kristall absorbiert werden. Trifft nun ein Photon auf ein Elektron eines Atoms, so beginnt das Elektron zu oszillieren und wird zu einer sekundären Röntgenquelle. Das Elektron erzeugt eine elektromagnetische Welle, die sich mit unveränderter Wellenlänge radial zur Oszillationsquelle ausbreitet. Jedoch ist die Amplitude der entstehenden Welle entsprechend der Streukraft des Elektrons verändert und die Phase ist um 180° verschoben. Elektronen in der Umgebung erzeugen ebenso eine Streuung ausgehend vom gleichen Photon, jedoch sind die Phasen dieser Elektronen verändert, da die Positionen der Elektronen variieren. Dieses Phänomen nennt man Phasenverschiebung. Da in der Einheitszelle viele benachbarte Atome des Proteins vorliegen, welche auf identische Art und Weise mit dem elektrischen Feldvektor der Röntgenphotonen interferieren, ist der Gangunterschied zwischen den an benachbarten Punkten gestreuten Wellen aus dem Einstrahlwinkel (μ) und den Betrachtungswinkel (ν) berechenbar. Da der Proteinkristall und damit verbunden die Einheitszelle (siehe 2.8.1) ein dreidimensionales Gebilde mit den Achsen a, b und c darstellt, müssen insgesamt drei sogenannte Laue-Gleichungen (Gleichungen 2.13) gleichzeitig für eine gemeinsame Richtung des ein- und des ausfallenden Strahls erfüllt sein.

$$a \cos \mu_a + a \cos \nu_a = n_1 \lambda$$

 $b \cos \mu_b + b \cos \nu_b = n_2 \lambda$ (Gleichungen 2.13)
 $c \cos \mu_c + c \cos \nu_c = n_3 \lambda$

wobei n_1 - n_3 ganze Zahlen sind. Wie aus den *Laue-Gleichungen* abgeleitet, muss der Einfallswinkel gleich dem Ausfallwinkel sein und einen ganz bestimmten Wert annehmen, so dass alle drei *Laue-Gleichungen* erfüllt sind. Dabei zeigten Vater W. Henry Bragg und Sohn W. Lawrence Bragg, dass sich dieser spezielle Winkel ableiten lässt, indem man den Gangunterschied der nächst tiefer im Gitter liegenden Ebene kennt und somit erfüllen nur die Winkel θ bei denen der Gangunterschied

$$2d \sin \theta = n\lambda \tag{Gleichung 2.14}$$

mit n = 1, 2, 3... ist, diese Bedingung. Das Bragg'sche Gesetz (Gleichung 2.14) und die Laue-Gleichungen (Gleichungen 2.13) definieren somit die Bedingungen, unter denen ein Röntgenbeugungsreflex des Proteinkristalls auftritt. Diese Reflexe (Beugungsmaxima) können mit Hilfe eines Detektors, der in einem bekannten Abstand zum Kristall positioniert ist, aufgefangen werden. Die Summe der einzelnen Reflexe, die auf den Detektor treffen, nennt man Beugungs- oder Diffraktionsmuster. Da in einem Protein die Elektronen nicht isoliert, sondern mit Atomen und Bindungen assoziiert vorliegen, spricht man von Elektronendichteverteilungen aus dem das erhaltene Streumuster resultiert. Die einzelnen Streumuster eines Datensatzes (Serie von Beugungsbildern) und damit verbunden die Intensitäten der einzelnen Reflexe können mit geeigneten Programmen indiziert (Bestimmung der Gitterkonstanten und Raumgruppe des Kristalls), integriert und skaliert werden. Bei der Integration werden die Intensitäten der Reflexe an ihren zuvor bestimmten Positionen (wiedergegeben durch die Miller'schen Indizes h, k, l) für alle Bilder des Datensatzes ermittelt. Durch die Skalierung werden die Intensitäten identischer Reflexe, die in den einzelnen Bildern des Datensatzes mehrfach auftauchen auf eine identische Skalierung gebracht (scaling) und anschließend gemittelt (merging). Anhand ihrer gemessenen Intensitäten, die per Definition identisch sein sollten, ist zudem eine statische Fehlerabschätzung möglich.

Wie bereits erwähnt, hat jedes Atom im Kristall Einfluss auf das Streumuster. Dieses Streumuster ist mathematisch gesehen eine Fourier-Transformation des streuenden Proteins:

$$\rho(r) = \frac{1}{V} \sum_{-h}^{h} \sum_{-k}^{k} \sum_{-l}^{l} F_{hkl} \cdot \exp[-2\pi i (hx + ky + lz - \alpha_{hkl})]$$
 (Gleichung 2.15)

letzteres beschrieben durch die Elektronendichteverteilung der einzelnen Atome im Raum. Dabei stellt $\rho(r)$ die Elektronendichteverteilung dar und F_{hkl} die Strukturfaktoramplituden. Diese werden direkt aus den Intensitäten der Beugungsreflexe der Datensammlung erhalten, denn die Strukturfaktoramplituden sind proportional zur Quadratwurzel der gemessenen Intensitäten (I_{hkl}) der einzelnen Reflexe. Die Parameter h, k und l (Miller'schen Indizes), mit denen die Reflexe im reziproken Raum eindeutig gekennzeichnet sind, korrespondieren mit den drei Dimensionen, mit der sich auch die Einheitszelle des Kristalls definiert. Der

Ausdruck α_{hkl} stellt die Phase (Phasenwinkel) für jeden einzelnen Reflex dar. Die Phasen können nicht direkt aus dem Beugungsexperiment erhalten werden, die Lösung des so genannten "kristallographischen Phasenproblems" wird in Abschnitt 2.8.3 weiter erläutert. Bevor die Proteinkristalle mittels Röntgenstrahlen gemessen werden konnten, wurde die Mutterlösung der Kristalle auf ihren Gefrierschutz getestet. Da die Messungen der Kristalle in der Regel bei 100 K stattfinden, muss das geordnete Gefrieren von Wassermolekülen, die sich ebenso in den Proteinkristallen befinden, verhindert werden. Wird das geordnete Einfrieren der Wassermoleküle nicht unterdrückt, bilden diese Strukturen wie in Eiskristallen. Als Folge streuen die Eiskristalle durch die strukturelle Anordnung der Wassermoleküle ebenso und es erscheinen charakteristische Eisringe auf dem Beugungsmuster, die die Auswertung der Proteinstreuung erschweren oder unmöglich machen. Aus diesem Grund muss der Kristalllösung ein Gefrierschutzmittel (*cryoprotectant*), sofern sie dieses noch nicht besitzt, zugesetzt werden. Als *cryoprotectant* dienen Glycerol oder andere Alkohole, Ethylenglycol, MPD, Saccharose (Sucrose) oder Polyethylenglycole mit niedrigen mittleren molaren Massen. Der Gefrierschutz von Proteinkristallen ist nicht trivial, sondern kann stark vom

Proteinkristalle, mit denen Messungen durchgeführt werden sollten, wurden durch eine Nylonschlinge (*Loop*) (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) mit geeigneter Größe dem Kristallisationstropfen entnommen. Der sich im *Loop* befindliche Proteinkristall wurde vor der Messung kurz in die entsprechende Mutterlösung, welche als Gefrierschutz zusätzlich 15% (v/v) Glycerol enthielt, getaucht. Für die Kristalle des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin konnte durch die Zugabe von 25% (v/v) (*R,R*)-(-)-2,3-Butandiol als Gefrierschutzmittel die beste Streuung erhalten werden. Überschüssige Pufferlösung wurde durch vorsichtiges Abstreifen des *Loops* entfernt. Anschließend wurde der *Loop* auf dem Goniometerkopf platziert und zentriert. Mit Hilfe des Goniometers kann die Position des *Loops* und somit die Lage des Kristalls durch Veränderung der Winkel entsprechender Achsen während der Messung variiert werden.

cryoprotectant abhängig sein, wie das Beispiel 2,3-Butandiol zeigt (Sutton, 1992).

Die Röntgenmessungen und Datensammlung der Proteinkristalle fanden am hauseigenen Drehanoden-Röntgengenerator (MicroMax007, Rigaku/MSC, Tokio, Japan) mit einer maximalen Leistung von 0,8 kW (40 kV, 20 mA) statt. An diesem Gerät wird eine monochromatische Cu- K_{α} -Röntgenstrahlung mit einer Wellenlänge von 1,5418 Å erzeugt. Die Detektion der Streuung erfolgte mit Hilfe eines Saturn 944+ Detektors (CCD++, Rigaku/MSC, Japan). Bei der Aufnahme vollständiger Datensätze wurden Rotationsaufnahmen mit einem Drehwinkelinkrement von $\Delta \varphi = 0,5^{\circ}$ gesammelt. Die Dauer

des Beschusses der Einzelaufnahmen mit Röntgenstrahlung variierte bei den verschiedenen Datensätzen je nach Streueigenschaften des Kristalls zwischen 5 und 60 s. Des Weiteren wurden Datensätze der entsprechenden Proteinkristalle am Berliner Elektronenspeicherring für Synchrotronstrahlung (BESSY II, Helmholtz-Zentrum Berlin) an der Messeinrichtung BL 14.1 bzw. BL 14.2 gemessen.

Für die Indizierung und Integration der Intensitäten mittels Fourier-Transformation standen folgende Programme zur Verfügung: Rigaku CrystalClear (d**TREK*) (Pflugrath, 1999), *MOSFLM* (Powell, 1999; Leslie A.G.W., 1992), *HKL*2000 (Otwinowski Z. und Minor W., 1997) und *XDS* (Kabsch, 1993; Kabsch, 2010a; Kabsch, 2010b). Die Skalierung der Intensitäten erfolgte mittels *Scala* (Evans, 2006) einem Programm der CCP4-*Suite* (Collaborative Computational Project, 1994) bzw. XSCALE.

2.8.3 Lösung des Phasenproblems und Strukturlösung

Wie bereits oben erwähnt geht die Phaseninformation während der Messung der Proteinkristalle verloren. Da für die Bestimmung der Elektronendichteverteilung durch Fourier-Transformation (Gleichung 2.15) sowohl die Strukturfaktoramplituden (F_{hkl}) als auch die Phasen (α_{hkl}) benötigt werden, müssen die Phasen ebenfalls experimentell ermittelt werden. Im Laufe der Jahre wurden verschiedene Methoden entwickelt, die sich in den meisten Fällen Unterschiede im Verhalten verschiedener spezifischer Elemente zunutze machen. So nutzt single anomalous diffraction (SAD) oder multi-wavelength anomalous diffraction (MAD) ein durch Absorption bedingtes "anomales" Streuverhalten bestimmter Atome aus. Natürliche, im Protein vorkommende Elemente außer H, C, N und O können aufgrund ihrer zusätzlichen Elektronen, welche bei signifikanten Wellenlängen (Absorptionskanten) mittels Röntgenstrahlen angeregt werden können, im Vergleich zu den leichteren Elementen (H, C, N und O) bei dieser Anregung eine Streuung aufweisen. Dabei etablierte sich vor allem das so genannte sulfur-SAD (S-SAD) (Dauter et al., 1999), bei dem die im Protein natürlich vorkommenden Schwefelatome von Methionin- und Cysteinresten Energie absorbieren können. Weiterhin können Proteine mit spezifischen Elementen, wie z. B. Schweratomen oder Atomen mit stärkeren anomalen Signal, modifiziert und das anomale Signal dieser in den Kristalle genutzt werden (Walsh et al., 1999). Dies geschieht z. B. beim MAD mittels Selenomethionin, wo anstelle von Methioninresten, in denen Schwefel enthalten ist, die Aminosäure Selenomethionin in das Protein eingebaut wird. Se besitzt eine Röntgenabsorptionskante bei $\lambda = 0.98$ Å und ist damit bei dieser Wellenlänge gut durch sein anomales Signal lokalisiert. Einen anderen Ansatz bietet die Methode des *single isomorphous replacement* (SIR) bzw. *single isomorphous replacement anomalous scattering* (SIRAS) oder dessen Varianten *multiple isomorphous replacement* (MIR) bzw. *multiple isomorphous replacement anomalous scattering* (MIRAS), bei denen aus mehreren gesammelten Datensätzen die Differenzen berechnet werden. Dabei werden vor allem die Differenzen in der Streuung zwischen den Proteinelementen und Schwermetallen bzw. Schweratomderivaten ausgenutzt, welche nachträglich in den Proteinkristall diffundiert (*gesoakt*) werden (Sun *et al.*, 2002; Sun und Radaev, 2002), um zuerst die Position (und damit die Phasen) der Schwermetalle zu bestimmen. Diese Informationen können dann für die Berechnung der Phasen des Proteins genutzt werden. Typische Schweratome, die für solche *soaks* genutzt werden, sind z. B. Halogenide Br-, T und I³⁻. Edelgase, die für diese Experimente verwendet werden, sind Xe und Kr oder es werden klassischer Weise Elemente wie Au, Pt und Hg in Form ihrer Salze genutzt.

Eine weitere Methode ist die des molekularen Ersatzes (molecular replacement, MR) (Rossmann, 2001). Dabei wird eine der Zielstruktur ähnliche bereits bekannte Struktur verwendet. Mit dieser ähnlichen Struktur und den davon bekannten Phasen werden die Phasen und unter Einbeziehung der Strukturfaktoramplituden die Elektronendichteverteilung für die Zielstruktur ermittelt. Des Weiteren können über die "Direkten Methoden" ebenso die Phasen bestimmt werden. Diese Methode eignet sich nur für Strukturen mit wenigen Atomen (≤1000) und benötigt hohe Auflösungen (≤ 1,2 Å) und ist somit für Makromoleküle wie Proteine ungeeignet. Jedoch werden die Phasen von Schweratomen in Proteinkristallen durch direkte Methoden bestimmt, da diese Schweratome meist nur in geringer Anzahl im Proteinkristall vorkommen. Seit einigen Jahren entwickelt sich eine weitere Methode, dass so genannte ultraviolet radiation damage-induced phasing (UV-RIP) (Ravelli et al., 2005; Nanao et al., 2005; Nanao und Ravelli, 2006; Schönfeld et al., 2008). Bei dieser Methode wird zuerst ein nativer Datensatz aufgenommen und anschließend wird der Kristall mit einer hohen Dosis UV-Licht oder Röntgenstrahlen beschossen. Dieser Beschuss verursacht Strahlenschäden an den Elementen im Kristall (z. B. das Aufbrechen von Disulfidbrückenoder die Decarboxylierung von Glutamat- und Aspartatresten). Anschließend wird ein zweiter Datensatz des Kristalls aufgenommen. Ist nun die Streuung durch die Strahlenschäden zwischen den zwei Datensätzen verschieden, so erhält man eine Differenz in den Signalen, aus denen dann die Phasen ermittelt werden können. Eine Übersicht über die verschiedenen Methoden bietet Faust et al. (Faust et al., 2008; Faust et al., 2010). Da in der vorliegenden Dissertation die Phasen ausschließlich mittels molekularen Ersatz (MR) bestimmt wurden, wird diese Methode im folgendem etwas genauer erläutert.

Die mathematischen Grundlagen für MR wurden im Jahre 1962 durch Michael Rossmann und David Blow dargelegt (Rossmann und Blow, 1962). Der Begriff replacement kann besser mit dem Begriff "Umorientierung" übersetzt werden, denn beim MR wird versucht, eine bekannte Struktur in der Einheitszelle der Zielstruktur zu orientieren. Entscheidend beim MR ist die Strukturähnlichkeit zwischen dem Suchmodell und der Zielstruktur. Die Sequenzidentität zwischen der Such- und Zielstruktur, die für die Auswahl eines geeigneten templates herangezogen wird, ist zweitrangig, jedoch erhöhen größere Sequenzidentitäten die Wahrscheinlichkeit ähnlicher bzw. vergleichbarer Gesamtstrukturen, Domänenstrukturen oder Faltungstypen. Für Proteine mit einer Sequenzidentität von mehr als 30% kann das Phasenproblem in vielen Fällen erfolgreich durch MR gelöst werden. Beim MR werden die Strukturfaktoren des Suchmodells mit den Strukturfaktoren, die durch die Aufnahme, Integration und Skalierung des Datensatzes der Zielstruktur erhalten wurden, verglichen. Dabei wird angenommen, dass, wenn die Differenz zwischen den Strukturfaktoren des Suchmodells und den im Experiment erhaltenen Strukturfaktoren am geringsten ist, die Orientierung an diesen Punkt übereinstimmt. Zur Orientierung des Suchmodells im Raum wird eine so genannte Patterson-basierende Rotations-Translations-Suchmethode genutzt (Crowther und Blow, 1967; Crowther, 1972). Dabei werden mit dem Suchmodell Rotationen in allen drei Dimensionen der Einheitszelle der Zielstruktur durchgeführt. Dies geschieht so lange, bis definierte intramolekulare Vektoren der Pattersonmethode am besten miteinander korrelieren. Daran schließt sich eine schnelle Translationssuche in allen drei Dimensionen an, bis intermolekulare Pattersonvektoren am besten übereinstimmen. Da die maximale Korrelation der Rotation nicht immer die richtige ist, werden durch diese teils kleinen Fehler in der Rotation trotz korrekter Translation keine oder schlechte Lösungen für die Phasen erhalten. Nichtsdestotrotz bietet MR auch durch die Einführung von maximum likelihood molecular replacement-Funktionen eine schnelle und effektive Möglichkeit zur Lösung des Phasenproblems (Read, 2001).

Das MR wurde mit dem Programm *Phaser* (McCoy *et al.*, 2007; McCoy, 2007) der CCP4-*Suite* (Collaborative Computational Project, 1994) durchgeführt. Beim MR für die r-Trypsiligase-Strukturen wurde die Rattentrypsin-Struktur mit dem PDB-Code 3FP8 (Zakharova *et al.*, 2009) als *template* verwendet. Da der PDB-Eintrag einen Komplex aus der Rattentrypsin-Variante Ser195Ala und BPTI beinhaltet, wurden vor dem MR die Koordinaten von BPTI und aller Solvens- sowie Puffermoleküle entfernt. Um einen Phasen- bzw.

Modellbias (Verzerrung der Elektronendichten durch die Phasen des Suchmodells) zu vermeiden (Read, 1986), wurde die *occupancy* (Besetzungsgrad) der Aminosäurepositionen 60, 143, 151, 189 und 195 vor dem MR im Suchmodell auf null gesetzt, da sich dort die Aminosäurereste des Suchmodells von denen im Zielprotein unterscheiden.

Für das MR der b-Trypsiligase-Strukturen wurde als template die Struktur mit dem PDB-Code 1MTS (Stubbs et al., 1995) verwendet. Dabei wurden wie oben bereits beschrieben alle Solvens-, Inhibitor- und Puffermoleküle entfernt und die occupancy der Aminosäurereste, welche zwischen Such- und Zielstruktur nicht übereinstimmen, initial auf den Wert Null gesetzt. Um einen weiteren Phasen- bzw. Modellbias zu vermeiden, wurden nach den ersten Analysen der Zielstrukturen ebenso die Koordinaten des autolysis loop (AS 142 - 152) sowie der N-terminalen Aminosäurereste 16 - 19, des surface loop I (AS 184A - 193) und des surface loop II (AS 216 - 223) aus dem Suchmodell 1MTS gelöscht. Zur Lösung des Phasenproblems des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin wurde neben dem Suchmodell mit dem PDB-Code 1MTS ebenso der PDB-Code 1SLU (Brinen et al., 1996) genutzt. Dabei wurden aus diesem PDB-Code, welcher die Daten für einen Komplex aus einer Rattentrypsin-Variante und einer Ecotin-Variante beinhaltet, nur die Koordinaten der Ecotin-Variante als Suchmodell für das MR verwendet. Wie oben bereits beschrieben wurden alle Segmente der Aktivierungsdomäne aus dem Suchmodell 1MTS gelöscht und die occupancy der Aminosäurereste, welche sich zu dem hier untersuchten Komplex unterschieden, im Suchmodell 1SLU auf Null gesetzt.

2.8.4 Manuelle Strukturanpassung und Strukturverfeinerung

Falls die Phasenbestimmung mittels MR erfolgreich verläuft, erhält man eine erste Struktur basierend auf dem Suchmodell, welches zum MR eingesetzt wurde. Weiterhin erhält man durch die Fourier-Transformation (Gleichung 2.15) eine erste Elektronendichteverteilung. Diese so genannten Elektronendichtekarten sowie die erhaltenen Koordinaten sind im Vergleich zur finalen Struktur unterschiedlich, wobei noch die Aminosäurereste des Suchmodells vorhanden sind und durch die der Zielstruktur ersetzt werden müssen. Weiterhin müssen Bindungslängen bzw. -winkel kontrolliert oder auch Solvens- und Puffermoleküle sowie mögliche Kofaktoren eingefügt werden. Dieser Korrektur, die manuell durchgeführt wird, folgt die so genannte Strukturverfeinerung. Die korrekten Koordinaten verbessern dabei die Phaseninformation, was zusammen mit der Verfeinerung in einer besseren Elektronendichte resultiert. Beim manuellen Einbau können jedoch ebenso Fehler durch den

Experimentator entstehen, welche sich dann negativ auf die Berechnung der neuen Elektronendichteverteilung bzw. auf das interpretierte Strukturmodell auswirken. Um diese Fehler und somit einen Modellbias zu vermeiden bzw. zu minimieren, werden die gemessenen Strukturfaktoramplituden des Experiments F_{obs} (*observed* = beobachtet) mit den berechneten Strukturfaktoramplituden F_{calc} (*calculated* = berechnet) der Strukturanpassung verglichen. Der Parameter, der diese Beziehung widerspiegelt, heißt R-Faktor (R_{cryst}) und wird während der Strukturverfeinerung wie folgt berechnet:

$$R_{cryst} = \sum \frac{\left\| F_{obs} \right| - \left| F_{calc} \right\|}{\left| F_{obs} \right|}$$
 (Gleichung 2.16)

Dabei stellen $|F_{obs}|$ die Strukturfaktoramplituden dar, die durch Streuung des Kristalls erhalten wurden und $|F_{calc}|$ die Strukturfaktoramplituden, die mit der gebauten Struktur erhalten wurden. Wenn nun alle $|F_{calc}|$ identisch zu allen $|F_{obs}|$ wären, d. h. die gebaute Struktur zu 100% mit der gemessenen Elektronendichteverteilung übereinstimmt, dann würde R_{cryst} den (theoretischen) Wert Null erreichen. Je kleiner der Wert von R_{cryst} nun ist, desto besser stimmt die gebaute Struktur demnach mit den gemessenen Daten überein. Ein weiterer Parameter, der sensitiv auf Fehler (u. a. generiert durch Modellbias) in der verfeinerten Struktur hinweist, ist der so genannte "Freie R-Faktor" (R_{free}) (Brünger, 1992). Für den R_{free} werden 5 - 10% der Reflexe nicht mit für die Verfeinerung benutzt. Dieser so genannte Test set von R_{free} wird dann mit den R_{cryst} (die verfeinerten Reflexe: $Working\ set$) verglichen. Die Differenz zwischen R_{cryst} und R_{free} sollte so gering wie möglich gehalten werden und beträgt in gut verfeinerten Strukturen nicht mehr als 5%.

Die manuelle Anpassung und Korrektur der Strukturen erfolgte mit Hilfe des Programms COOT (Emsley und Cowtan, 2004; Emsley *et al.*, 2010). Die Strukturverfeinerung wurde mit den Programm REFMAC5 (Murshudov *et al.*, 1997) der CCP4 Suite (Collaborative Computational Project, 1994) bzw. mit dem Programm PHENIX (Adams *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2011) durchgeführt.

2.8.5 Validierung, Analyse und Visualisierung der Strukturen

Wie bereits oben beschrieben können bei der manuellen bzw. auch bei der computergestützten Anpassung Fehler auftreten bzw. kann es zur Abweichung von Parametern kommen, die für Proteinstrukturen entscheidend sind. So besitzen die Bindungen der Atome, die natürlich in Proteinen vorkommen, bestimmte Bindungslängen und Bindungswinkel (Lovell *et al.*, 2003) bzw. treten nur bestimmte Rotamere für die Aminosäureseitenketten auf (Ponder und Richards, 1987). Weiterhin kann z. B. bei den Aminosäureresten Asparagin, Glutamin und Histidin nicht unterschieden werden, an welcher Position der Seitenkette sich der Stickstoff und Sauerstoff (Asparagin und Glutamin) bzw. der Stickstoff und Kohlenstoff (Histidin) befindet, da der Unterschied dieser Elemente in der Elektronendichteverteilung nicht unterscheidbar ist. Jedoch kann anhand möglicher Interaktionen mit der Umgebung, wie z.B. Wasserstoffbrückenbindungen, eine mehr oder weniger klare Tendenz der Positionierung dieser Elemente stattfinden.

Die Validierung der Strukturen erfolgte mit Hilfe des Web-Servers MolProbity (Chen et al., 2010; http://molprobity.biochem.duke.edu/). Zur Analyse der erhaltenen Strukturen wurde weiterhin der PISA-Server (Krissinel und Henrick, 2007; Krissinel. 2010; http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot int/pistart.html) verwendet, um Kontaktflächen wie auch Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zu berechnen. Die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit Hilfe des Programms PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.3 Schrödinger, LLC; http://www.pymol.org/). Die schematischen Darstellungen der Protein-Ligand- bzw. der Protein-Protein-Interaktionen wurden mit den Programmen LipPlot und LigPlus generiert (Wallace et al., 1995).

3 Ergebnisse

3.1 EK-Trypsin

Ziel der Untersuchungen dieses Teils der Dissertation war es, die Aktivität des generierten EK-Trypsins gegenüber verschiedenen Substraten qualitativ und wenn möglich quantitativ zu bestimmen. Diese Ergebnisse sollten zeigen, ob mit rationalem, strukturbasierten Enzymdesign die Spezifität einer Serinprotease (Enteropeptidase) auf eine strukturverwandte Serinprotease (Trypsin) übertragbar ist. Dabei sollte die Analyse des natürlichen Substrats (Trypsinogen) sowie makromolekularer Substrate mit einer Enteropetidase-Erkennungssequenz chromophoren Peptidsubstraten gegenüber vorgezogen werden, um den möglichen biotechnologischen Einsatz von EK-Trypsin bei der proteolytischen Spaltung von Fusionspartnern zu ermitteln. Weiterhin sollte die durch die Propeptidsequenz mögliche Selbstaktivierung des Zymogens (EK-Trypsinogen) untersucht werden, um die Notwendigkeit der Aktivierung des Zymogens zu überprüfen.

3.1.1 Genexpression, Rückfaltung und Reinigung von EK-Trypsinogen

Die Genexpression von EK-Trypsinogen wurde wie unter 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden den Schüttelkulturen vor der Induktion mit IPTG und vor der Zellernte Proben entnommen, um den erfolgreichen Verlauf der Genexpression zu verfolgen. Die Zellen der entsprechenden Proben wurden mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt, für 5 min aufgekocht und anschließend erfolgte die Analyse mittels SDS-PAGE (2.5.2). In Abbildung 3.1 A ist der Verlauf der Genexpression von EK-Trypsinogen erkennbar. Dabei ist 3 h nach Zugabe von IPTG eine deutliche Überexpressionsbande unterhalb der Markerbande von 31 kDa ersichtlich. Da das EK-Trypsinogen-Konstrukt eine molare Masse von ca. 26,2 kDa aufweist, gibt die Position der Überexpressionsbande einen ersten Hinweis für die erfolgreiche Produktion von EK-Trypsinogen.

Nachdem die *E. coli-*Zellen geerntet und aufgeschlossen und die IBs isoliert wurden (2.3.2), erfolgte die Renaturierung von EK-Trypsinogen wie unter 2.3.3 beschrieben. Nach dem finalen Dialyseschritt wurde die EK-Trypsinogen-Lösung wie unter 2.3.4 erläutert mittels Affinitätschromatographie von Verunreinigungen befreit. Durch eine anschließende

SDS-PAGE (Abbildung 3.1 B) wurden die Elutionsfraktionen analysiert. Die Bahn 3 der SDS-PAGE (Abbildung 3.1 B) bestätigt das Vorhandensein von EK-Trypsinogen in den Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie. Als Referenz wurde Trypsin (2.1.5) mitgeführt, welches aufgrund seiner geringeren molaren Masse (MW: 23,8 kDa) unterhalb der Bande von EK-Trypsinogen (MW: 26,2 kDa) läuft. Die SDS-PAGE zeigt, dass mit der Reinigung mittels Nickelaffinitätssäule EK-Trypsinogen in hoher Reinheit erhalten werden kann.

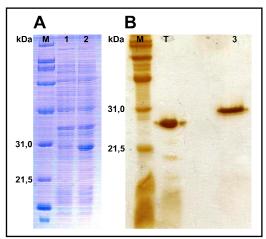


Abbildung 3.1: Herstellung von EK-Trypsinogen. A: SDS-PAGE der Genexpression von EK-Trypsinogen (M: Molekulargewichtsstandard, 1: Zellen vor Zugabe von IPTG, 2: Zellen vor der Zellernte), B: Affinitätschromatographie von EK-Trypsinogen (M: Molekulargewichtsstandard, T: Trypsin, 3: Elutionsfraktion der Affinitätschromatographie bei 100% Laufpuffer B).

Um aktiviertes EK-Trypsin zu erhalten, wurde wie unter 2.3.4 beschrieben, EK-Trypsinogen gegen einen Puffer mit einen pH-Wert im neutralen Bereich dialysiert und anschließend für 2 h bei 25 °C inkubiert. An diesen Aktivierungsschritt schloss sich eine Gelfiltration (2.3.5) an, welche das Aktivierungspeptid vom nunmehr aktiven EK-Trypsin trennen sollte.

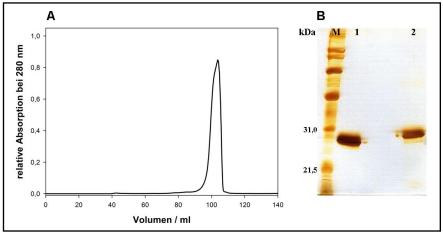


Abbildung 3.2: Aktivierung zu EK-Trypsin. A: Chromatogramm der Gelfiltration von EK-Trypsin (Es wurde die Absorption bei 280 nm gegen das Elutions-Volumen aufgetragen), B: SDS-PAGE der Gelfiltration von EK-Trypsin (M: Molekulargewichtsstandard, 1: Fraktion der Gelfiltration bei einem Retentionsvolumen bei 100 ml, 2: EK-Trypsinogen nach der Affinitätschromatographie).

Wie in Abbildung 3.2 A ersichtlich eluiert EK-Trypsin bei der hier verwendeten Gelfiltrationssäule bei einem Retentionsvolumen von ca. 100 ml. Ein zweiter Peak, der auf das Aktivierungspeptid schließen ließe, ist im Chromatogramm aufgrund der fehlenden Aminosäuren Trp, Tyr und Phe, welche bei dieser Wellenlänge absorbieren, nicht ersichtlich. Die Vollständigkeit der Aktivierung sowie die Reinheit von EK-Trypsin wurden wiederum mittels SDS-PAGE (Abbildung 3.2 B) analysiert.

Da in der Bahn 1 der Abbildung 3.2 B nur eine Bande erkennbar ist, wird deutlich, dass die Aktivierung von EK-Trypsinogen zu EK-Trypsin mit der gewählten Strategie vollständig stattgefunden hat. Zwischen Bahn 1 und Bahn 2, welches das zur Aktivierung eingesetzte EK-Trypsinogen zeigt, ist ein klarer Unterschied in der molaren Masse zu erkennen, dieser Unterschied resultiert aus dem abgespaltenen Aktivierungspeptid (HHHHHHHFPVDDDDK, MW: 1773 Da). Weiterhin ist in Abbildung 3.2 B zu erkennen, dass unter den gewählten Reinigungsbedingungen kein weiterer Selbstverdau (Autolyse) von EK-Trypsin stattgefunden hat. Hinsichtlich der Ausbeute konnten die bereits publizierten Werte (Tziridis, 2008) von 3,1 mg gereinigtem EK-Trypsin pro Liter Expressionsmedium bestätigt werden.

3.1.2 Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen

Mit der im Aktivierungspeptid (HHHHHHHFPVDDDDK, MW: 1773 Da) enthaltenen Enteropeptidase-Erkennungssequenz DDDDK besteht die Möglichkeit, dass sich EK-Trypsin bei vorhandener Spezifität gegenüber dieser Erkennungssequenz aus seinen Zymogen (EK-Trypsinogen) durch Selbstaktivierung generiert.

Wie in den Reinigungsschritten bereits zu erkennen war, zeigt EK-Trypsinogen diese Selbstaktivierung zu EK-Trypsin (Abbildung 3.2 B). Diese Selbstaktivierung gibt einen ersten Hinweis auf die Aktivität von EK-Trypsinogen und EK-Trypsin gegenüber der Enteropeptidase spezifischen Erkennungssequenz DDDDK. Um diese Selbstaktivierung zu quantifizieren, wurde wie unter 2.6.1 beschrieben EK-Trypsinogen in einen Puffer mit basischem pH-Wert transferiert und der zeitliche Verlauf der Selbstaktivierung (Autolyse) mittels SDS-PAGE analysiert. Dabei zeigt sich wie in Abbildung 3.3 dargestellt, dass bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 8,0 nach 10 min eine vollständige Aktivierung stattfindet.

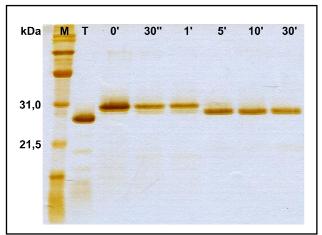


Abbildung 3.3: SDS-PAGE der Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen. M: Molekulargewichtsstandard, T: Trypsin, 0' - 30': Inkubationszeit im Puffer mit einem pH Wert von 8,0.

Die SDS-PAGE der Selbstaktivierung verdeutlicht, dass die Abspaltung des Aktivierungspeptids quantitativ stattfindet. Weiterhin ist erkennbar, dass die Spaltung in der gewählten Zeitdauer spezifisch ist, da kein weiterer Abbau des entstandenen EK-Trypsins erkennbar ist.

Die Analyse der Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen zu EK-Trypsin zeigt, dass durch den Transfer der S2/S4-Bindetaschen von Enteropeptidase in Trypsin, welche mit den Aminosäuresubstitutionen S96K/N97R/T98R/L99K in Trypsin verbunden sind, die Spezifität der Protease von der ursprünglichen Spaltung nach basischen Aminosäureresten (Lys/Arg) hin zu einer Spaltstelle mit der DDDDK-Sequenz modifiziert werden kann.

3.1.3 Aktivität von EK-Trypsin gegenüber Trypsinogen

Trypsinogen als natürliches Substrat von Enteropeptidase wird von diesem aktiviert, indem die Spaltung nach dem in der Natur vorhandenen Aktivierungspeptid VDDDK (siehe Anhang A.1) erfolgt und der neu entstandene N-Terminus (Ile16) des Trypsins eine "begrabene Salzbrücke" zum Asp194 ausbildet (Hess *et al.*, 1970; Fersht, 1972). Da Trypsinogen von Enteropeptidase aktiviert wird, stellt es ein ideales makromolekulares Substrat dar, um die Spezifität von EK-Trypsin mit der der Wildtyp-Enteropeptidase zu vergleichen. Da bovines Trypsinogen im Vergleich zu Trypsin eine 10⁷-fach geringere Aktivität aufweist (Bode, 1979), kann über die Aktivität des bei der Spaltung von Trypsinogen entstandenen Trypsins auf die Aktivität von EK-Trypsin und Enteropeptidase geschlossen werden.

Trypsinogen wurde wie unter 2.6.2 beschrieben mit EK-Trypsin versetzt und die Aktivität des entstandenen Trypsins gegenüber dem Trypsin-Substrat Pefachrome tPA bestimmt. Als

Kontrollen der Aktivierung von Trypsinogen wurden ebenfalls Ansätze mit den Proteasen Enteropeptidase bzw. Trypsin durchgeführt. In Abbildung 3.4 sind die ermittelten spezifischen Aktivitäten (A_S) gegen der Zeit aufgetragen. Für alle Messungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert dieser gegen den entsprechenden Zeitpunkt aufgetragen. Dabei lagen die Fehler (Daten nicht gezeigt), die zwischen den Einzelmessungen auftraten, unter 10% des Mittelwertes.

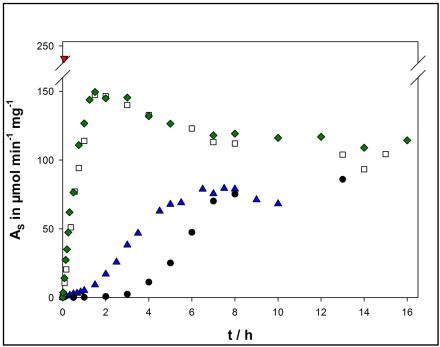


Abbildung 3.4: Spezifische Aktivität (A_S) von Trypsinogen gegenüber der Zeit. A_S von Trypsinogen durch: Selbstaktivierung (\bullet), in Gegenwart von Enteropeptidase (\square), in Gegenwart von Trypsin (\blacktriangle), in Gegenwart von EK-Trypsin (\bullet). Als Vergleich ist die A_S von aktivem Trypsin in (\blacktriangledown) dargestellt.

Wie in Abbildung 3.4 (●) zu erkennen und bereits aus der Literatur bekannt ist (Davie und Neurath, 1955), kann sich Trypsinogen selbst durch Autolyse aktivieren. Es ist sichtbar, dass die Aktivität von Trypsinogen anfangs nahe Null liegt und erst nach ca. 3 h ein Anstieg der spezifischen Aktivität zu verzeichnen ist. Die Kurve zeigt dann zwischen 3 - 7 h einen exponentiellen Anstieg, was zu erwarten ist, wenn mehr und mehr Trypsin-Moleküle aktiviert werden und diese wiederum Trypsinogen aktivieren können. Ab einer Inkubationszeit von 8 h tritt ein Plateau der spezifischen Aktivität bei rund 80 µmol min⁻¹ mg⁻¹ ein. Im Vergleich dazu liegt die spezifische Aktivität von aktivem Trypsin (▼) rund dreifach höher (220 µmol min⁻¹ mg⁻¹).

Durch die initiale Zugabe von Trypsin (Abbildung 3.4 ▲) kann Trypsinogen im Vergleich zur Autolyse schneller aktiviert werden. Die spezifische Aktivität des generierten Trypsins steigt nach wenigen Minuten der Inkubation an und nicht wie bei der Autolyse erst nach 3 h. Die maximale spezifische Aktivität ist nach ca. 6 h erreicht, doch genau wie bei der Autolyse wird

ein Wert von ca. 80 µmol min⁻¹ mg⁻¹ auf. Dieser Wert liegt im Vergleich bei nur 36% der spezifischen Aktivität von aktivem Trypsin. Weiterhin zeigt sich nach einer Inkubationszeit von 8 h eine Abnahme der spezifischen Aktivität, was auf eine weitere (unspezifische) hydrolytische Spaltung und somit Abbau in der Trypsinogen-Trypsin-Lösung hinweist.

Aus dem Verlauf der spezifischen Aktivität des aktivierten Trypsins, welches durch Enteropeptidase erzeugt wurde (Abbildung 3.4 □), wird deutlich, dass Enteropeptidase Trypsinogen deutlich schneller als Trypsin aktiviert. Die maximale spezifische Aktivität ist hier bereits nach ca. 90 min erreicht. Sie beträgt zu diesem Zeitpunkt ca. 150 μmol min⁻¹ mg⁻¹, was 68% der spezifischen Aktivität von Trypsin darstellt. Die Erkenntnis, dass mit Enteropeptidase, dem natürlichen Aktivator von Trypsinogen, nur 68% der spezifischen Aktivität vom aktiven Trypsin erreicht werden und die Tatsache, dass die spezifische Aktivität vom aktivierten Trypsinogen nach 2 h Inkubation wieder abnimmt, lassen einen zur Aktivierung parallel verlaufenden Prozess vermuten, bei dem Trypsinogen bzw. das entstandene Trypsin abgebaut werden.

Durch die Zugabe von EK-Trypsin zu Trypsinogen (Abbildung 3.4 ♦) wird dieses gleich schnell aktiviert wie dies durch Enteropeptidase geschieht. Aus der Abbildung 3.4 wird ersichtlich, dass auch durch Zugabe von EK-Trypsin die maximale spezifische Aktivität des entstandenen Trypsins nach ca. 90 min erreicht ist. Im Vergleich zu Enteropeptidase besitzt die durch Zugabe von EK-Trypsin maximal erreichte spezifische Aktivität des entstandenen Trypsins ebenfalls einen Wert von ca. 150 µmol min⁻¹ mg⁻¹ und ebenso sinkt diese nach Erreichen des Maximums mit zunehmender Inkubationszeit stetig.

Der Vergleich der proteolytischen Ansätze von Trypsin (Abbildung 3.4 ▲), Enteropeptidase (Abbildung 3.4 □) und EK-Trypsin (Abbildung 3.4 ◆) zu Trypsinogen zeigt, dass EK-Trypsin dieses genauso schnell und in der gleichen Menge aktiviert, wie dies durch den natürlichen Aktivator Enteropeptidase geschieht. Die Zeit bis zur maximal erreichten spezifischen Aktivität, der maximale Wert der spezifischen Aktivität von ca. 150 µmol min⁻¹ mg⁻¹ und das anschließende Absinken der spezifischen Aktivität verlaufen für EK-Trypsin und Enteropeptidase identisch und unterscheiden sich klar von den durch Trypsin erhaltenen Ergebnissen. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass durch die Substitution der Aminosäurereste S96K/N97R/T98R/L99K in Trypsin eine Verschiebung der Spezifität gegenüber der Enteropeptidase-Erkennungssequenz und damit zu Enteropeptidase-Substraten möglich ist.

3.1.4 Aktivität von EK-Trypsin gegenüber DDDDK-RNase A

DDDDK-RNase A (Watkins et al., 2011) besitzt eine künstliche Enteropeptidase-Spaltstelle innerhalb des Proteins. Diese Spaltstelle wurde zwischen die Aminosäurereste Ala20 und Ser21 der Wildtyp-RNase A insertiert. Wie die Wildtyp-Struktur von RNase A (PDB-Code 7RSA, Wlodawer et al., 1988) erkennen lässt, befindet sich die Region, in welche die Enteropeptidase-Spaltstelle eingefügt wurde, in einem oberflächenexponierten loop. Dabei sowohl für Wildtyp-RNase A mit Subtilisin (Richards, 1958) und für DDDDK-RNase A mit Enteropeptidase (Watkins et al., 2011) gezeigt werden, dass dieser loop für die proteolytische Spaltung zugänglich ist. Bei der proteolytischen Spaltung von DDDDK-RNase A an dieser Spaltstelle entsteht in Analogie zur Spaltung von RNase A mit Subtilisin der so genannte RNase S Komplex (S von der Subtilisinspaltung zwischen Ala20 und Ser21 in Wildtyp-RNase A, Richards, 1958). Dieser besteht aus dem S-Peptid (AS 1 - 20, Nummerierung nach Wildtyp-RNase A) zuzüglich der C-terminal davon insertierten Sequenz DDDDK und dem S-Protein (AS 21 - 124). Da die Interaktion zwischen S-Peptid und S-Protein durch nicht-kovalente Bindungen gekennzeichnet ist, trennen sich beide Ketten während der Denaturierung, z. B. durch Aufkochen. Der Unterschied in der molaren Masse zwischen beiden Spezies (DDDDK-RNase A: 14271 Da, S-Protein: 11534 Da) kann mittels SDS-PAGE (2.5.2) detektiert werden.

Bei Proteinen sind die Zugänglichkeit der Erkennungssequenz und die Architektur der Substratbindetaschen der Protease entscheidende Kriterien für die erfolgreiche proteolytische Spaltung. DDDDK-RNase A stellt ein makromolekulares Substrat, ähnlich einem Fusionsprotein, dar, das eine interne Erkennungssequenz besitzt. Die Spaltung dieser Erkennungssequenz durch EK-Trypsin sollte Schlussfolgerungen über den möglichen biotechnologischen Einsatz bei der Spaltung von Fusionsproteinen durch die modifizierte Enzymvariante EK-Trypsin zulassen.

Die proteolytische Spaltung von DDDDK-RNase A wurden bei 37 °C wie unter 2.6.3 beschrieben mit Enteropeptidase, Trypsin und EK-Trypsin verfolgt. Die Spaltung von DDDDK-RNase A durch Enteropeptidase (Abbildung 3.5 A) zeigt, dass nach 10 min bereits ca. 50% des Substrats gespalten sind und die vollständige Spaltung zu DDDDK-RNase S nach 1 h abgeschlossen ist. Die Abbildung 3.5 A verdeutlicht, dass das hier sichtbare S-Protein hydrolysestabil gegenüber Enteropeptidase ist. Allein nach 6 h Inkubation ist ein leichter "Schmier" unterhalb des S-Proteins zu erahnen, was auf weitere (unspezifische) Proteolyse hindeuten würde.

Durch die Zugabe von Trypsin zu DDDDK-RNase A findet keine Proteolyse statt (Abbildung 3.5 B). Da die DDDDK-RNase A Bande über den analysierten Zeitraum eine gleich bleibende Intensität besitzt, kann die eingesetzte DDDDK-RNase A wie Wildtyp-RNase A unter diesen Bedingungen nicht von Trypsin hydrolytisch gespalten werden (Arnold *et al.*, 1996).

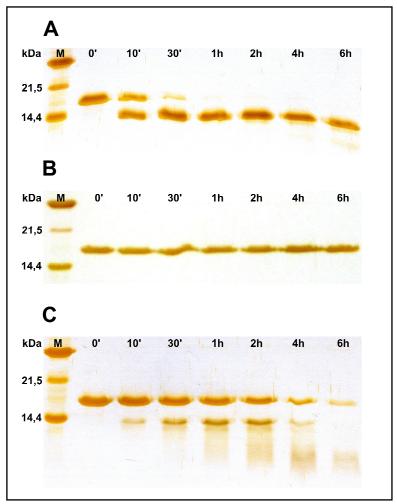


Abbildung 3.5: SDS-PAGE der proteolytischen Spaltung von DDDDK-RNase A. Spaltung von DDDDK-RNase A durch A: Enteropeptidase, B: Trypsin, C: EK-Trypsin (M: Molekulargewichtsstandard, 0' - 6h: Inkubationszeit mit der entsprechenden Protease bis zum Stoppen der Reaktion.

Die Proteolyse von DDDDK-RNase A durch EK-Trypsin (Abbildung 3.5 C) zeigt, dass das Substrat gespalten wird, da eine Bande auf der Höhe vom S-Protein auftaucht. Jedoch ist im Vergleich zur Spaltung mit Enteropeptidase (Abbildung 3.5 A) erkennbar, dass die Proteolyse durch EK-Trypsin langsamer verläuft. Nach einer Inkubationszeit von 6 h ist immer noch eine Bande auf Höhe des Substrats sichtbar, wohingegen die Spaltung durch Enteropeptidase nach 1 h vollständig abgeschlossen ist. Ein weiterer Punkt, der bei der Inkubation von DDDDK-RNase A mit EK-Trypsin auffällt, ist, dass das Produkt auf Höhe des S-Proteins nicht stabil ist bzw. die Bandenintensität nicht proportional zur abnehmenden

Bandenintensität des Substrats zunimmt. Das deutet darauf hin, dass EK-Trypsin neben der Enteropeptidase-Erkennungssequenz weitere Peptidbindungen in der entstandenen DDDDK-RNase S hydrolysiert.

3.1.5 Aktivität von EK-Trypsin gegenüber DDDDK-RNase S

Ein entscheidender Faktor bei der Verwendung von Proteasen zur proteolytischen Spaltung von Fusionsproteinen ist die Selektivität gegenüber der Erkennungssequenz, die gespalten werden soll. Um zu untersuchen, ob EK-Trypsin selektiv die DDDDK-Sequenz erkennt und keine Präferenz gegenüber den basischen Aminosäureresten (Lys/Arg) aufweist, wie es bei Wildtyp-Trypsin der Fall ist, wurde DDDDK-RNase S als Substrat verwendet. RNase S ist im Gegensatz zu RNase A bei 25 °C gegenüber Trypsin nicht proteolysestabil. So wurden 6 - 7 Peptidbindungen in RNase S identifiziert, die durch Trypsin proteolytisch gespalten werden können (Allende und Richards, 1962). Daher sollte auch DDDDK-RNase S im Vergleich zu der gegenüber Trypsin stabilen DDDDK-RNase A proteolytisch angreifbar sein und soll so als Substrat für die unspezifische Spaltung bzw. die Spaltung Trypsin-Erkennungssequenzen (nach den basischen Aminosäureresten Lys oder Arg) verwendet werden.

DDDDK-RNase S wurde wie unter 2.6.4 beschrieben hergestellt und anschließend mit der entsprechenden Protease versetzt. Da sich bei der Probenvorbereitung zur SDS-PAGE das S-Peptid mit der sich C-terminal befindlichen DDDDK-Sequenz vom S-Protein trennt, kann letzteres mit dieser Methode detektiert werden, wohingegen das S-Peptid mit der Lauffront läuft. Da das S-Protein allein jedoch 7 - 8 Peptidbindungen besitzt, die durch Trypsin gespalten werden können (Allende und Richards, 1962), genügt die Analyse des S-Proteins für das Vorhandensein von unspezifischer Proteolyse bzw. der Proteolyse nach Trypsin-Erkennungssequenzen.

In Abbildung 3.6 A ist erkennbar, dass durch Zugabe von Trypsin das S-Protein, d. h. DDDDK-RNase S proteolytisch abgebaut wird. Dabei entsteht bereits nach 5 min ein Intermediat, welches unterhalb der Bande des S-Proteins sichtbar ist. Dieses Intermediat ist bis zu einer Zeit von 10 min deutlich sichtbar und wird dann genau wie das S-Protein innerhalb der folgenden 20 min vollständig abgebaut. Dieses Intermediat deutet auf eine bevorzugte Spaltstelle von Trypsin im S-Protein hin. Während der ersten 30 min der Inkubation ist ein deutlicher "Schmier" unterhalb des entstehenden Intermediats zu sehen, was auf kleinere Peptidfragmente des S-Proteins hindeutet. Ab einer Inkubationszeit ≥ 30 min

treten zwei schwache Banden im unteren Bereich des Gels auf, die bis zum letzten Messpunkt von 4 h nach Trypsin-Zugabe sichtbar bleiben. Dabei könnte es sich um zwei Fragmente vom S-Protein handeln, die nicht weiter hydrolysiert werden können und mit zunehmender Zeit akkumulieren. Die Bande oberhalb vom S-Protein entspricht ungespaltener DDDDK-RNase A. Für die Spaltung durch die Protease Subtilisin an der Position zwischen dem Ala20 und Ser21 in Wildtyp-RNase A ist bekannt, dass nicht das gesamte Ausgangsprotein gespalten wird und somit eine schwache Bande auf der Höhe der RNase A zurück bleibt (Watkins et al., 2011). Für DDDDK-RNase A war dies in den vorherigen Studien (siehe 3.1.4) nicht erkennbar, es könnte jedoch unterhalb der Detektionsgrenze der Proteinbanden im Gel liegen.

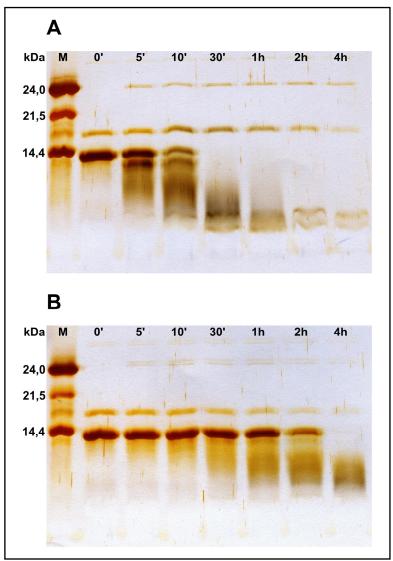


Abbildung 3.6: SDS-PAGE der proteolytischen Spaltung von DDDDK-RNase S. Spaltung von DDDDK-RNase S durch A: Trypsin, B: EK-Trypsin (M: Molekulargewichtsstandard, 0' - 4h: Inkubationszeit mit der entsprechenden Protease bis zum Stoppen der Reaktion.

Nach Zugabe von EK-Trypsin (Abbildung 3.6 B) zu DDDDK-RNase S zeigt sich eine Abnahme der Bandenintensität des Ausgangsproteins bis hin zum vollständigen Verschwinden nach vierstündiger Inkubation. Die SDS-PAGE veranschaulicht den weiteren hydrolytischen Abbau von DDDDK-RNase S und damit verbunden eine Nebenaktivität von EK-Trypsin ähnlich der von Trypsin. Bei EK-Trypsin erfolgt die Hydrolyse des S-Proteins im Vergleich zu Trypsin langsamer, da bis zu einer Inkubationszeit von 2 h noch S-Protein sichtbar ist (Abbildung 3.6 B), wobei im Gegensatz zur Spaltung durch Trypsin kein Fragment akkumuliert (Abbildung 3.6 A). Dies deutet darauf hin, dass EK-Trypsin keine bevorzugte Spaltsequenz im S-Protein besitzt. Schlussfolgernd bedeutet dies, dass durch die Substitutionen S96K/N97R/T98R/L99K in Trypsin die Spezifität gegenüber den von Trypsin bevorzugten primären Spaltstellen herabgesetzt wird. Trotzdem erkennt man bei Inkubationszeiten zwischen 5 min und 2 h in der Abbildung 3.6 B eine Zunahme eines "Schmiers" unterhalb der Bande vom S-Protein, was auf eine generelle Hydrolyse möglicher sekundärer Spaltstellen hinweist, die mit zunehmender Inkubationszeit ansteigt. Nach einer Inkubationszeit von 4 h ist der "Schmier" reduziert, was darauf hindeutet, dass die Peptide weiter abgebaut werden. Weiterhin ist nach der Inkubation mit EK-Trypsin über 4 h im Vergleich zu den identischen Inkubationszeiten mit Trypsin keine Akkumulation von stabilen Peptidfragmenten sichtbar. Ein Grund dafür könnte die verlangsamte Hydrolyse durch EK-Trypsin sein, so dass im gemessenen Zeitraum der Inkubation diese Fragmente noch nicht angereichert werden. Andererseits könnten diese Peptidfragmente weitere Spaltstellen für EK-Trypsin, welches anscheinend eine veränderte Spezifität im Vergleich zu Trypsin besitzt, aufweisen, so dass eine weitere Hydrolyse möglich wäre.

3.2 Trypsiligase, Eglin C-Varianten und YRH-Ecotin

Die molekularen Details der durch Proteasen enzymatisch durchgeführten Peptid-Ligation sind sowohl vom Mechanismus wie auch vom strukturellen Aspekt her weitestgehend unbekannt. Trypsin als eine Protease, die hinsichtlich ihres Mechanismus und ihrer Struktur sehr gut charakterisiert ist, kann hinsichtlich dieser Fragestellungen als Modellenzym verwendet werden bzw. das molekulare Verständnis der enzymvermittelten Peptid-Ligation erweitern und somit möglicherweise die Generierung neuer und effektiverer Proteasen, die zur Peptid-Ligation befähigt sind, erleichtern. So sind in der unter 1.6.2 beschriebenen Enzymvariante Trypsiligase eine proteolytische Aktivität und eine Aktivität bzgl. der reversen Proteolyse (Peptid-Ligation) vereint. Die Hydrolyseaktivität zur Spaltung zwischen Tyr und Arg in der YRH-Sequenz kann biotechnologisch zur Spaltung von Fusionsproteinen eingesetzt werden. Aufgrund der Ligaseaktivität, die N-terminal der RH-Sequenz eine Peptidbindung mit einem C-terminalen Argininrest knüpfen kann, können sowohl Semi-Synthesen von Peptidfragmenten als auch Proteinmodifizierungen durchgeführt werden (Liebscher, 2007).

Die strukturelle Analyse von Trypsiligase mit Hilfe der Röntgenkristallstrukturanalyse sowie mögliche Interaktionen mit makromolekularen Inhibitoren stehen im Mittelpunkt der folgenden Experimente.

3.2.1 Ligandfreie Strukturen von Trypsiligase

Die ligandfreie Kristallisation von r-Trypsiligase bzw. b-Trypsiligase und die anschließende Röntgenkristallstrukturanalyse sollte Erkenntnisse über den Einfluss der Mutationen (K60E/N143H/E151H/D189K in r-Trypsiligase, K60E/N143H/Y151H/D189K in b-Trypsiligase) auf die Struktur auf molekularer Ebene liefern. Die Erkenntnisse sollten mögliche Erklärungen für die im Gegensatz zu Wildtyp-Trypsin vorhandene Aktivität der Peptid-Ligation liefern und somit Schlussfolgerungen für die Generierung neuer Proteasen, die zur Ligation von Peptiden befähigt sind, zulassen.

Die zwei Trypsiligase-Isoformen (r-Trypsiligase und b-Trypsiligase) wurden wie unter 2.4.4 beschrieben produziert und gereinigt, so dass die Proteine in reiner Form in $50\,\text{mM}$ HEPES-NaOH, $0.1\,\text{M}$ NaCl, $10\,\text{mM}$ CaCl₂, $100\,\text{\mu}$ M ZnCl₂ pH 7.8 zur Kristallisation zur Verfügung standen.

3.2.1.1 b-Trypsiligase Kristallformen I und II

Zunächst wurde versucht, b-Trypsiligase unter Pufferbedingungen zu kristallisieren, die den für die Aktivität verwendeten physikochemischen Parametern wie z. B. dem pH-Bereich oder der Puffersubstanz entsprachen (Liebscher, 2007; Sharkhuukhen, 2009). Dabei wurden verschiedene Kristallisationsbedingungen mit HEPES-Puffer und unterschiedlichen Präzipitanzien verwendet (Sharkhuukhen, 2009). Die Kristallisation wurde im *hanging-drop vapor diffusion*-Verfahren mit einer Konzentration von 50 mg ml⁻¹ b-Trypsiligase angesetzt. Es konnten nach 10 - 21 Tagen in verschiedenen Ansätzen Kristalle beobachtet werden (Abbildung 3.7), welche der Röntgenkristallstrukturanalyse unterzogen wurden, so dass die Struktur des Proteins gelöst werden konnte.

Bei diesen Kristallisationsansätzen konnten die aus der Literatur bekannte trigonale Form der (Abbildung 3.7 A und C) mit der Raumgruppe $P3_{1}21$ (Kristallform I, $a = 54,51; b = 54,51; c = 107,08; \alpha = 90^{\circ}; \beta = 90^{\circ}; \gamma = 120^{\circ}$) wie auch orthorhombische Kristalle (Abbildung 3.7 B) mit der Raumgruppe $P2_{1}2_{1}2_{1}$ (Kristallform II, $a = 44,67; b = 54,09; c = 97,33; \alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$ beobachtet werden und analysiert (Anhang A.3). Für die Kristalle wurden entsprechende Datensätze wie unter 2.8.2 beschrieben aufgenommen. Als *cryoprotectant* wurde einem Tropfen des Kristallisationspuffers 15% (v/v) Glycerol zugeführt. Das Phasenproblem (2.8.3) konnte durch MR mit der Struktur des PDB-Codes 1MTS (Stubbs et al., 1995) als Suchmodell gelöst werden.

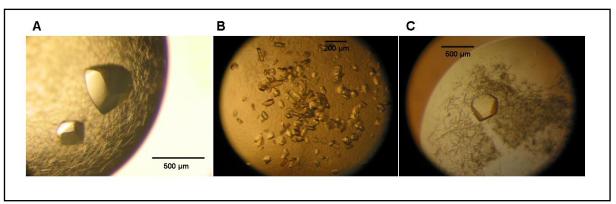


Abbildung 3.7: Kristalle von b-Trypsiligase in HEPES-Puffer mit verschiedenen Präzipitanzien. Kristalle von b-Trypsiligase gewachsen in A: 0,1 M HEPES-NaOH, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 20% (w/v) PEG 4000, pH 7,3 (Kristallform I, P3₁21), B: 0,1 M HEPES-NaOH, 2 M (NH₄)₂SO₄, 2% (v/v) PEG 400, pH 7,6 (Kristallform II, P2₁2₁2₁) und C: 0,1 M HEPES-NaOH, 20% (w/v) PEG 4000, pH 7,4 (Kristallform I, P3₁21).

Da die gelösten Strukturen von b-Trypsiligase unter den angegebenen Kristallisationsbedingungen sowohl in der trigonalen Raumgruppe P3₁21 (Kristallform I) als auch in der orthorhombischen Raumgruppe P2₁2₁2₁ (Kristallform II) ähnliche Eigenschaften

aufweisen, werden die Eigenschaften im folgendem nur anhand des in Abbildung 3.7 C gezeigten trigonalen Kristalls der Kristallform I und der daraus resultierten Struktur beschrieben und detailliert dargestellt. Die Statistiken der Datensammlung und die finalen Parameter der Strukturverfeinerung für diesen Kristall sind im Anhang A.4 zu finden. Der Kristall mit einem b-Trypsiligase-Molekül in der asymmetrischen Einheit zeigte Beugungsreflexe bis zu einer Auflösung von 1,00 Å.

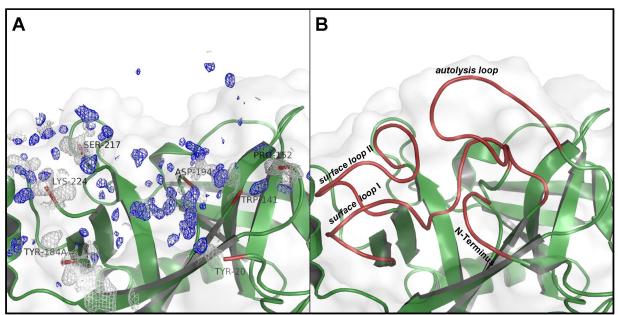


Abbildung 3.8: Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase (Kristallform I) im Vergleich mit der von Wildtyp-Trypsin. A: Cartoondarstellung der vier Segmente der Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase. Die letzten Aminosäurereste, für die eine Elektronendichte sichtbar ist, sind rot eingefärbt, wohingegen die restliche Struktur grün eingefärbt ist. Die 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) und die Fo-Fc Differenzelektronendichte (3 σ, blaues Gitter) im Umkreis der Aktivierungsdomäne von 2 Å, wie sie im Wildtyp-Trypsin vorliegt, sind ebenfalls gezeigt. B: Cartoondarstellung der Aktivierungsdomäne von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, nicht publiziert von Bruszkiewicz *et al.*, Auflösung: 0,8 Å). Die Segmente der Aktivierungsdomäne sind in rot, das restliche Trypsin in grün dargestellt.

Für die Kristallstrukturen von b-Trypsiligase in den Kristallformen I und II konnte keine Elektronendichten im Bereich vom N-Terminus bis zum Aminosäurerest 19 sowie für die Aminosäurereste 142 - 151, 185 - 193, 219 - 223 beobachtet werden (Abbildung 3.8 A). Bei diesen Aminosäureresten bzw. Regionen handelt es sich um die Bereiche der Aktivierungsdomäne von Trypsin (siehe 1.5.2).

Die Überlagerung der Aminosäurereste von b-Trypsiligase, die nicht in der Aktivierungsdomäne lokalisiert sind und für die Elektronendichten sichtbar sind, mit der Struktur von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, Auflösung: 0,8 Å, nicht publiziert von Bruszkiewicz *et al.*) zeigt nur sehr geringe strukturelle Unterschiede (Abbildung 3.9). So beträgt die mittlere quadratische Abweichung (*root mean square deviation*, RMSD) in den Positionen der Cα-Atome zwischen diesen beiden Strukturen 0,27 Å. Dabei zeigen

Aminosäurereste, die sich vor oder nach den Segmenten der Aktivierungsdomäne befinden (wie z. B. Tyr20 mit einem RMSD-Wert von 0,72 Å oder Lys224 mit 0,61 Å), die größten Abweichungen.

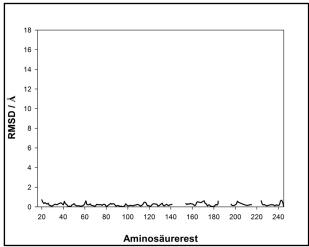


Abbildung 3.9: RMSD-Werte der Cα-Atome der Aminosäurereste von b-Trypsiligase und Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ). Für die Aminosäurereste der Aktivierungsdomäne konnten keine Elektronendichten identifiziert werden, so dass keine RMSD-Werte für diese ermittelt werden konnten und sich in diesen Bereichen Unterbrechungen im Graph befinden. Die Y-Achse der Graphen, welche RMSD-Werte darstellen, wurde immer auf 18 Å skaliert, um den Vergleich zu erleichtern.

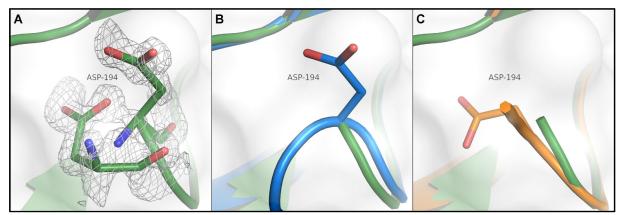


Abbildung 3.10: Konformationen des Asp194 aus der Kristallform I von b-Trypsiligase im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin und Wildtyp-Trypsinogen. A: Asp194 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit dessen 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ , graues Gitter) aus b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün), B: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, Cartoondarstellung in blau) und die Orientierung der Seitenkette von Asp194 (Stabdarstellung, C-Atome blau, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsin, C: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsinogen (PDB-Code 1TGB, Cartoondarstellung in orange, Fehlhammer *et al.*, 1977) und die Orientierung der Seitenkette von Asp194 (Stabdarstellung, C-Atome orange, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsinogen.

Die 2Fo-Fc Elektronendichte für den Aminosäurerest Asp194, welche sich an das unstrukturierte Segment der Aminosäurereste 185 - 193 anschließt, zeigt, dass sowohl die "aktive" als auch die "zymogene" Konformation vorhanden ist (Abbildung 3.10 A). Eine zusätzliche 2Fo-Fc Elektronendichte in diesem Bereich lässt vermuten, dass noch weitere Konformationen vorliegen. Alternative Konformationen für Asp194 wurden weder in

Wildtyp-Trypsin (Abbildung 3.10 B) noch in Wildtyp-Trypsinogen (Abbildung 3.10 C) beobachtet.

Weiterhin zeigt der katalytische Serinrest 195 von b-Trypsiligase in der Kristallform I zwei mögliche Konformationen (Abbildung 3.11 A). Dieses Phänomen von alternativen Konformationen des Ser195 ist aufgrund der Ausrichtung der katalytischen Triade bisher weder im aktivem Trypsin (Abbildung 3.11 B) noch im Trypsinogen (Abbildung 3.11 C) beschrieben worden.

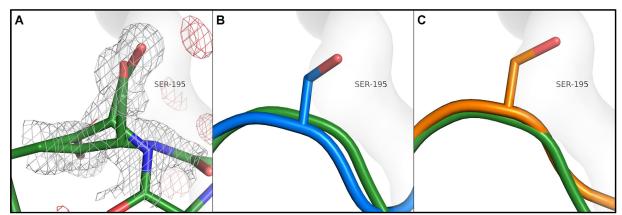


Abbildung 3.11: Konformationen des Ser195 aus der Kristallform I von b-Trypsiligase im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin und Wildtyp-Trypsinogen. A: Ser195 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit dessen 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) und Fo-Fc Differenzelektronendichte (-3σ, rotes Gitter, 4 Å um Ser195) aus b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün), B: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, Cartoondarstellung in blau) und die Orientierung der Seitenkette von Ser195 (Stabdarstellung, C-Atome blau, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsin, C: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsinogen (PDB-Code 1TGB, Cartoondarstellung in orange, Fehlhammer *et al.*, 1977) und die Orientierung der Seitenkette von Ser195 (Stabdarstellung, C-Atome orange, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsinogen.

Die Struktur von b-Trypsiligase (Kristallform I) zeigt mit den oben genannten Eigenschaften einen zymogenähnlichen Zustand. Im Vergleich zur Struktur des aktiven Trypsins (siehe Abbildung 1.8) sind Eigenschaften wie die "begrabene Salzbrücke" zwischen Ile16 und Asp194 und damit verbunden die Fixierung des *autolysis loops* und der *surface loops* I und II in b-Trypsiligase nicht erkennbar. Die Aktivierungsdomäne zeigt keine Elektronendichte für die Aminosäurereste, wie dies bereits aus verschiedenen Untersuchungen der Strukturen von Trypsinogen bekannt ist (Fehlhammer *et al.*, 1977). Die Elektronendichte für Asp194 und die zwei Konformationen des katalytischen Ser195 deuten unterschiedliche Konformationen in b-Trypsiligase an.

Die Substitutionen K60E/N143H/Y151H/D189K scheinen die Struktur von Trypsin von einem aktiv- zu einem zymogenähnlichen, weniger geordneten Zustand zu überführen. So kann durch den Austausch der Aminosäurereste das Fehlen von Wasserstoffbrückenbindungen, die im Wildtyp-Trypsin die entsprechenden Segmente der

Aktivierungsdomäne stabilisieren, für die erhöhte Flexibilität ausschlaggebend sein. Im Wildtyp-Trypsin interagiert Asp143 mit seinem N δ 2- und O δ 1-Atom z. B. über Wasserstoffbrückenbindungen mit Amidstickstoff- bzw. Carbonylsauerstoffatomen anderer Aminosäurereste des *autolysis loop* (Lys145, Gly148 oder Ser150). Dass diese oder ähnliche Interaktionen in b-Trypsiligase durch die Einführung des Histidinrestes an dieser Position vorhanden sind, ist unwahrscheinlich, da dieser Bereich in b-Trypsiligase unstrukturiert ist.

3.2.1.2 b-Trypsiligase Kristallform III

Des Weiteren wurde b-Trypsiligase im 96-well-Format mit allen vorhandenen Kristallisationskits (2.1.4) mit einer Konzentration von 10 mg ml⁻¹ zur Kristallisation angesetzt. Dabei konnten nach 14 Tagen in verschiedenen Bedingungen Kristalle beobachtet werden, die nach dieser Zeit nicht weiter wuchsen (Abbildung 3.12).

Dabei zeigten bereits die im 96-*well*-Format gewachsenen Kristalle Beugungsreflexe bis zu einer Auflösung von 1,7 Å. Für die Kristalle in Abbildung 3.12 B war ersichtlich, dass die Kristallisationsbedingung mit 0,1 M HEPES-NaOH, 16% (w/v) PEG 4000, 10% (w/v) 2-Propanol, 0,2 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,5 mit Ausnahme der 10% (w/v) 2-Propanol sehr ähnlich derer ist, die bereits zur Kristallisation in der Kristallform I und II von b-Trypsiligase führte (Abbildung 3.7). Auf Grund der bisher erhaltenen Kristallformen I und II von b-Trypsiligase (3.2.1.1) wurde diese Bedingung für weitere Analysen nicht weiter genutzt.

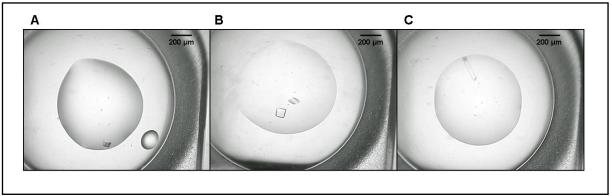


Abbildung 3.12: Kristalle von b-Trypsiligase aus dem 96-well-Format. Kristalle von b-Trypsiligase gewachsen in A: 0,1 M Tris-HCl, 20% (w/v) PEG 4000, 0,2 M Li_2SO_4 , pH 8,5, B: 0,1 M HEPES-NaOH, 16% (w/v) PEG 4000, 10% (w/v) 2-Propanol, 0,2 M (NH₄)₂SO₄, pH 7,5 und C: 0,1 M Tris-HCl, 25% (w/v) PEG 5000 MME, 0,2 M Li_2SO_4 , pH 8,5.

Die Kristallisation im 24-*well*-Maßstab wurde somit unter den in Abbildung 3.12 A und C erhaltenen Pufferbedingungen durchgeführt. Bei der Kristallisation im 24-*well*-Format zeigten die unter der Bedingung 0,1 M Tris-HCl, 20% (w/v) PEG 4000, 0,2 M Li₂SO₄, pH 8,5 gewachsenen Kristalle von b-Trypsiligase (Abbildung 3.13 A) die höchste Auflösung.

Deshalb wurde die Röntgenkristallstrukturanalyse an diesen Kristallen durchgeführt. Die Kristalle von b-Trypsiligase wuchsen unter den gewählten Kristallisationsbedingungen in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12_1$, mit den Zellparameter: $a = 54,5; b = 58,6; c = 66,8; \alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$ (Kristallform III) (Anhang A.3).

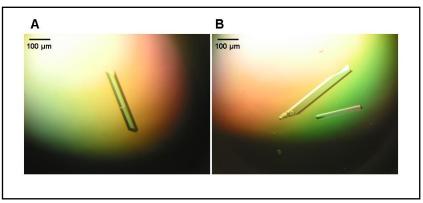


Abbildung 3.13 Kristalle von b-Trypsiligase im 24-*well-***Format.** Kristalle von b-Trypsiligase gewachsen in A: 0,1 M Tris-HCl, 20% (w/v) PEG 4000, 0,2 M Li₂SO₄, pH 8,5 (Kristallform III, P2₁2₁2₁), B: C: 0,1 M Tris-HCl, 25% (w/v) PEG 5000 MME, 0,2 M Li₂SO₄, pH 8,5 (Kristallform III, P2₁2₁2₁).

Die Statistiken der Datensammlung und die finalen Parameter der Strukturverfeinerung für die Kristallform III von b-Trypsiligase sind im Anhang A.5 aufgelistet. Die Beugungsbilder konnten bis zu einer maximalen Auflösung von 1,31 Å integriert und skaliert werden. Das Phasenproblem wurde wiederum mittels MR und die Struktur mit dem PDB-Code 1MTS (Stubbs et al., 1995) gelöst. Es konnte ein Molekül von b-Trypsiligase in der asymmetrischen Einheit ermittelt werden. Die Analyse der Elektronendichteverteilung für den Bereich der Aktivierungsdomäne zeigte für die Struktur von b-Trypsiligase in der Kristallform III eine eindeutige 2Fo-Fc Elektronendichte sowie eine positive Fo-Fc Differenzelektronendichte, welche auf fehlende Atome in der gebauten Struktur in der entsprechenden Region der Aktivierungsdomäne hinweist. Dabei wurde deutlich, dass die erhaltenen Konformationen der 4 Segmente der Aktivierungsdomäne nicht mit denen in der aktiven Konformationen des Wildtyp-Trypsins übereinstimmen. Es wurden deshalb wie unter 2.8.3 beschrieben die Regionen der Aktivierungsdomäne aus dem Suchmodell für das MR entfernt und anschließend das Lösen des Phasenproblems erneut durchgeführt. Die nun fehlenden Aminosäurereste wurden manuell in die erhaltene Struktur gebaut und anhand der Verfeinerungen auf ihre Richtigkeit überprüft.

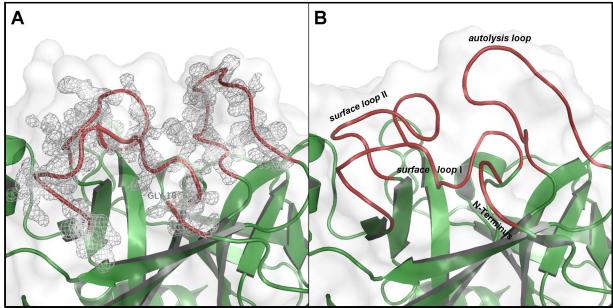


Abbildung 3.14: Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase aus der Kristallform III im Vergleich zur Aktivierungsdomäne von Wildtyp-Trypsin. A: Cartoondarstellung der vier Segmente der Aktivierungsdomäne (rot) mit dessen 2FoFc Elektronendichte (1σ, graues Gitter) von b-Trypsiligase, wobei die restliche Struktur grün dargestellt ist, B: Cartoondarstellung der Aktivierungsdomäne (rot) von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ), wobei die restliche Struktur grün dargstellt ist.

In der b-Trypsiligase-Struktur der Kristallform III wurde außer für die Reste Ile16 und Val17 eine Elektronendichte für alle Aminosäurereste gefunden. Dies ist ein Indiz dafür, dass das Ile16 bzw. die N-terminale Aminogruppe keine "begrabene Salzbrücke" zu Asp194 ausbildet und somit nicht die aktive Konformation vorliegt. Wie bereits erwähnt zeigen die Reste des *autolysis loop* sowie der *surface loops* I und II eine unterschiedliche Konformation im Vergleich zum aktiven Trypsin (Abbildung 3.14 A und B).

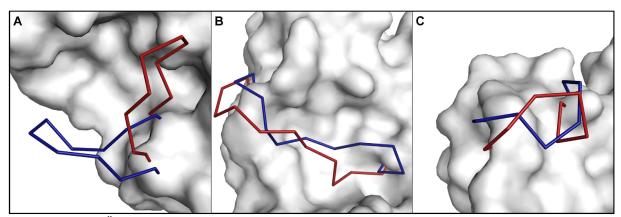


Abbildung 3.15: Überlagerung der Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase aus der Kristallform III mit Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ). Dargestellt ist die fiktive Oberfläche (weiß) aller Aminosäurereste von Trypsiligase, die nicht zum *autolysis loop* oder zu den *surface loops* I und II gehören. In Bänderdarstellung ist in A: der *autolysis loop*, B: der *surface loop* I und C: der *surface loop* II von b-Trypsiligase Kristallform III (rot) und von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, blau) gezeigt. Zur Orientierung der Lage zwischen den drei *loops* siehe auch Abbildung 1.8.

Die Überlagerung der Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase mit der aus Wildtyp-Trypsin verdeutlicht (Abbildung 3.15), dass die größten Unterschiede im *autolysis loop* zu finden sind. Dieser ist in der Struktur der Kristallform III von b-Trypsiligase um etwa 90° im Vergleich zu der Orientierung im aktiven Trypsin umgeklappt (Abbildung 3.15 A).

Dabei zeigte sich beim Vergleich zwischen der Struktur von b-Trypsiligase (Kristallform III) und der Struktur von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ), dass die RMSD-Werte der Cα-Atome nur in den vier Segmenten der Aktivierungsdomäne hoch sind (Abbildung 3.16 A). Da für die restlichen Aminosäuren niedrige RMSD-Werte auftreten, unterscheiden sich die Strukturen von b-Trypsiligase (Kristallform III) und Wildtyp-Trypsin außerhalb der Aktivierungsdomäne nicht wesentlich voneinander.

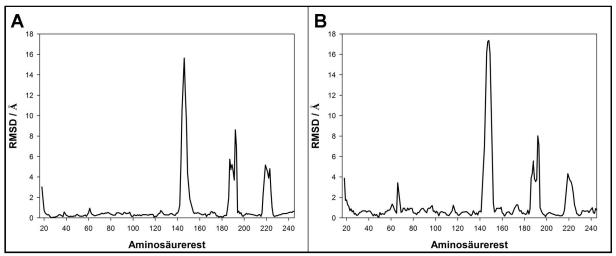


Abbildung 3.16: Vergleich der RMSD-Werte der Cα-Atome von b-Trypsiligase mit A: Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ) bzw. B: Wildtyp-Trypsinogen, welches mit Diisopropylphosphonat inhibiert wurde (PDB-Code 2TGD, nicht publiziert von Jones und Stroud). Für die Aminosäurereste Ile16 und Val17 konnten keine Elektronendichten identifiziert werden, so dass keine RMSD-Werte für diese ermittelt werden konnten und sich in diesem Bereich Unterbrechungen in den Graphen befinden.

Abbildung 3.16 A verdeutlicht den in Abbildung 3.15 gezeigten Befund, dass die größte Differenz in der räumlichen Anordnung der Aminosäurereste im *autolysis loop* zu finden ist. So liegt der RMSD-Wert in der Spitze für den Aminosäurerest Ser146 bei ca. 15,6 Å. Der durchschnittliche RMSD-Wert für die zwei Strukturen liegt bei 2,29 Å.

Auch der Vergleich zur Trypsinogen-Struktur (PDB-Code 2TGD, nicht publiziert von Jones und Stroud), welche durch die Inhibierung mit Diisopropylphosphonat in einen Übergangszustand und damit verbunden in eine Trypsin-ähnliche Struktur überführt wurde (siehe 1.5.2), zeigt klare Unterschiede in den RMSD-Werten der Cα-Atome der Aktivierungsdomäne (Abbildung 3.16 B). Dabei sind die maximalen RMSD-Werte mit nahezu 18 Å noch höher als beim Vergleich von b-Trypsiligase und Wildtyp-Trypsin (Abbildung 3.16 A). Somit resultiert ein durchschnittlicher RMSD-Wert der Cα-Atome für

den Vergleich von b-Trypsiligase und Wildtyp-Trypsinogen von 2,86 Å, welcher ebenso etwas größer als der zwischen b-Trypsiligase und Wildtyp-Trypsin ist.

Die Koordinaten der Aminosäurereste der Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase aus der Kristallform III deuten aufgrund der hohen Unterschiede in den RMSD-Werten auf einen Zustand hin, der nicht dem des aktiven Trypsins ebenso wenig dem eines Trypsin-ähnlichen Zustandes von Trypsinogen (PDB-Code 2TGD) gleicht. Da die Position der zwei ersten Aminosäurereste am N-Terminus nicht erkennbar war, kann ein zymogenähnlicher und damit verbunden ein Trypsinogen-ähnlicher Zustand angenommen werden.

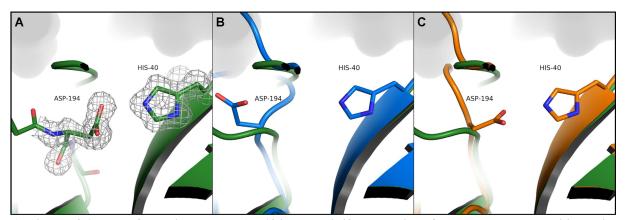


Abbildung 3.17: Konformationen von Asp194 und His40 der Kristallform III von b-Trypsiligase im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin und Wildtyp-Trypsinogen. A: Asp194 und His40 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit deren 2Fo-Fc Elektronendichten (1 σ, graues Gitter) aus b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün), B: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, Cartoondarstellung in blau) und die Orientierung der Seitenketten von Asp194 und His40 (Stabdarstellung, C-Atome blau, N-Atome dunkelblau, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsin, C: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsinogen (PDB-Code 1TGB, Cartoondarstellung in orange, Fehlhammer *et al.*, 1977) und die Orientierung der Seitenkette von Asp194 und His40 (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsinogen.

Der Vergleich der Konformation von Asp194 zeigt, dass diese in b-Trypsiligase eine Orientierung einnimmt, die zymogenähnlich bzw. Trypsinogen-ähnlich ist (Abbildung 3.17). So ist die Interaktion von Asp194 mit His40 der Zymogentriade in der Kristallform III von b-Trypsiligase eindeutig ersichtlich (Abbildung 3.17 A). Im Wildtyp-Trypsin nimmt die Seitenkette des Asp194 aufgrund der "begrabenen Salzbrücke" zum Ile16 seine aktive Konformation ein (Abbildung 3.17 B). Diese unterschiedliche Orientierung, vor allem in der Seitenkette des Asp194, wird durch die RMSD-Werte deutlich. So weist das Cα-Atom von Asp194 zwischen b-Trypsiligase und Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ) einen RMSD-Wert von 0,433 Å auf, wohingegen das Cγ-Atom einen Wert von 4,0 Å besitzt. Aus dem Vergleich der Abbildungen 3.16 A und B ist ersichtlich, dass das Asp194 im aktiven Trypsin mit seiner Seitenkette eine Position einnimmt, bei der in der Kristallform III von b-Trypsiligase das Polypeptidrückgrat verläuft. Im Vergleich zur bereits oben beschriebenen Kristallform I von

b-Trypsiligase (Abbildung 3.10) ist die 2Fo-Fc Elektronendichte hier an der Position von Asp194 eindeutig, so dass dieses mit einer *occupancy* von 1 verfeinert werden konnte.

Der Vergleich der Konformation von Asp194 in b-Trypsiligase (Abbildung 3.17 A) und Wildtyp-Trypsinogen (Abbildung 3.17 C) zeigt, dass sich die Ausrichtung des Asp194 nicht so stark unterscheidet wie es im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin (Abbildung 3.17 B) der Fall ist. So befindet sich die γ-Carboxygruppe von Asp194 in Trypsinogen an der Position der 2Fo-Fc Elektronendichte für die entsprechende Gruppe in b-Trypsiligase, was sich in den RMSD-Werten wiederspiegelt. So beträgt der RMSD-Wert für die Cγ-Atome 0,48 Å und ist somit signifikant kleiner als der oben erwähnte RMSD-Wert von Wildtyp-Trypsin und b-Trypsiligase von 4,0 Å für die identischen Atome. Es ist jedoch in Abbildung 3.17 C zu erkennen, dass sich die Positionen der Cβ-Atome (RMSD-Wert 1,015 Å) der b-Trypsiligase-und der Trypsinogen-Struktur erheblich unterscheiden. Es liegen zwischen der Kristallform III der b-Trypsiligase und der Trypsinogen-Struktur zwei unterschiedliche Rotamere der Seitenkette von Asp194 vor.

In der Trypsinogen-Struktur (Abbildung 3.17 C) ist jedoch zu beachten, dass die Aminosäurepositionen der Reste vor dem Asp194 aufgrund fehlender Elektronendichte der Aktivierungsdomäne (1.5.2) entsprechend den Positionen im aktiven Trypsin gebaut wurden. Damit ist auch der Verlauf des *surface loop* I von der wirklichen Orientierung in Trypsinogen in der Struktur mit dem PDB-Code 1TGB (Fehlhammer *et al.*, 1977) vermutlich verschieden. Diese Anpassung der Aktivierungsdomäne in Trypsinogen an die aktive Trypsin-Struktur kann ein Grund für die unterschiedlichen Rotamere im Vergleich zur b-Trypsiligase (Kristallform III) sein. Ein Vergleich mit der Elektronendichte des Trypsinogens an der Position Asp194 nach dem PDB-Code 1TGB (Fehlhammer *et al.*, 1977) war nicht möglich, da die benötigten Strukturfaktoramplituden nicht in der PDB hinterlegt waren.

Das katalytische Ser195 von b-Trypsiligase zeigt in der Kristallform III im Gegensatz zu der Kristallform I (Abbildung 3.11) bei der entsprechenden maximalen Auflösung nur eine Konformation.

Die im Gegensatz zu Wildtyp-Trypsin in Trypsiligase vorhandenen Aminosäurereste Glu60, His141, His153 und Lys189 sind in der Kristallform III der b-Trypsiligase strukturell aufgelöst (Abbildung 3.18). Dabei zeigte sich, dass die Aminosäurereste His143 und His151 wie bereits beschrieben (Brinen *et al.*, 1996) in räumlicher Nähe zu einander liegen (Abbildung 3.18 B). So weist das Nδ1-Atom von His143 zu dem Nε2-Atom von His151 eine Distanz von 3 Å auf, so dass eine Wasserstoffbrückenbindung ausgebildet werden könnte. In

der Umgebung dieser artifiziellen Metallbindestelle ist keine Elektronendichte erkennbar, die auf das Vorhandensein eines Metallions hindeutet.

Lys189, welches sich am Boden der S1-Bindetasche befinden sollte (Vergleich Abbildung 1.5 B und Abbildung 1.8), ist mit seiner Seitenkette an der Oberfläche lokalisiert. Da solvent-exponierte Aminosäurereste mit ihren Seitenketten oftmals keine bzw. nur schwache intramolekulare Wechselwirkungen besitzen, sind diese Seitenketten dann flexibel, wodurch für diese Atome keine bzw. nur eine schwache Elektronendichte vorhanden ist. Dies ist vermutlich auch der Grund, warum für Lys189 in der Kristallform III von b-Trypsiligase keine Elektronendichte nach dem Cδ-Atom mehr erkennbar ist, was für eine Flexibilität des Cε-Atoms und des Nζ-Atoms spricht.

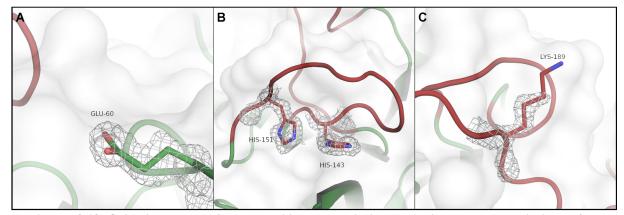


Abbildung 3.18: Orientierung der in b-Trypsiligase substituierten Aminosäurereste mit ihrer 2Fo-Fc Elektronendichte in der Kristallform III. Die Seitenketten von A: Glu60, B: His143 und His151, C: Lys189 sind mit ihren 2Fo-Fc Elektronendichten (1 σ , graues Gitter) in Stabdarstellung gezeigt. Dabei sind die Regionen der Aktivierungsdomäne in roter und die Bereiche außerhalb der Aktivierungsdomäne in grüner Cartoondarstellung eingefärbt. Entsprechend sind die C-Atome der Aminosäurereste in der Aktivierungsdomäne rot und C-Atome außerhalb der Aktivierungsdomäne grün gezeigt (N-Atome blau, O-Atome rot). Die Oberfläche von b-Trypsiligase ist weiß dargestellt.

Jedoch ist wie oben beschrieben zu beachten, dass die Aktivierungsdomäne in der Kristallform III von b-Trypsiligase und damit verbunden die Aminosäurereste eine Konformation ähnlich der im Zymogen einnehmen. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die in Trypsiligase eingeführten Reste bei einem Wechsel der Konformation vom zymogenähnlichen in den aktivähnlichen Zustand ebenso eine Änderung in ihrer Orientierung erfahren und so z. B. das Lys189 in die entstehende S1-Bindetasche wandert.

Aus den molekularen Details der Kristallform III von b-Trypsiligase stellt sich die Frage, warum die Segmente der Aktivierungsdomäne (1.5.2) hier eine starre, zymogenähnliche Konformation zeigen, wohingegen bei den Kristallformen I und II von b-Trypsiligase (3.2.1.1) keinerlei Elektronendichten und damit flexible Bereiche für die Aktivierungsdomäne detektiert wurden. Intramolekulare Wechselwirkungen wie Wasserstoffbrückenbindungen,

Salzbrücken oder Disulfidbrücken, sollten dahingehend keinen Einfluss haben, da sie aufgrund der gleichen Sequenz der zur Kristallisation eingesetzten b-Trypsiligase in allen Strukturen gleichermaßen vorhanden bzw. nicht vorhanden sein sollten. So sollte die Wasserstoffbrückenbindung, die in der Kristallform III von b-Trypsiligase zwischen dem Nδ1-Atom von His151 und dem Carbonylsauerstoffatom von Trp141 (Distanz: 2,82 Å) ebenso in den Kristallformen I und II von b-Trypsiligase (3.2.1.1) ausgebildet werden können. Eine Erklärung für diese unterschiedliche Anordnung der Aktivierungsdomäne könnten die intermolekulare verbunden Kristallpackung und damit Wechselwirkungen symmetrieverwandten b-Trypsiligase-Molekülen sein. So kristallisiert b-Trypsiligase in der Kristallform I ($a = 54,51; b = 54,51; c = 107,08; \alpha = 90^\circ; \beta = 90^\circ; \gamma = 120^\circ$) in der Raumgruppe P3₁21 und in der Kristallform II ($a = 44,67; b = 54,09; c = 97,33; \alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$) in P2₁2₁2₁, wobei die Aktivierungsdomäne eine hohe Flexibilität und damit verbunden keine Elektronendichte aufweist. In der Kristallform III von b-Trypsiligase wird hingegen die Raumgruppe $P2_12_12_1$ ($a = 54.5; b = 58.6; c = 66.8; \alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) mit zur Kristallform II unterschiedlichen Parametern der Einheitszelle gefunden (Anhang A.3). Es zeigt sich, dass sich in der Nähe des autolysis loop in der Kristallform III von b-Trypsiligase ein symmetrieverwandtes Molekül (Koordinaten: $x - \frac{1}{2}$; -y - $\frac{1}{2}$, -z) befindet, welches in den Kristallformen I und II der b-Trypsiligase nicht zu finden ist (Abbildung 3.19).

Eine Analyse der Kontaktflächen der in der Kristallform III ermittelten b-Trypsiligase und des deren symmetrieverwandten Molekülen mit Hilfe PISA-Servers (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot int/pistart.html) zeigt, dass die Kontaktfläche mit 562 Å² zu dem symmetrieverwandten Molekül im Vergleich zu allen anderen in der Nähe befindlichen symmetrieverwandten Molekülen am größten ist. Es interagieren 20 Aminosäurereste aus b-Trypsiligase mit 16 Aminosäureresten aus dem symmetrieverwandten Molekül, wobei neun Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet werden (Anhang A.6). Im autolysis loop können His143, Ser146 und Gly148 - His151 als Reste identifiziert werden, die sich in der Kontaktfläche zu dem symmetrieverwandten Molekül befinden. Dabei bilden Gly148 und Ser150 sowie der Aminosäurerest Asp153, welcher sich an den autolysis loop anschließt, Wasserstoffbrücken zum symmetrieverwandten Molekül aus.

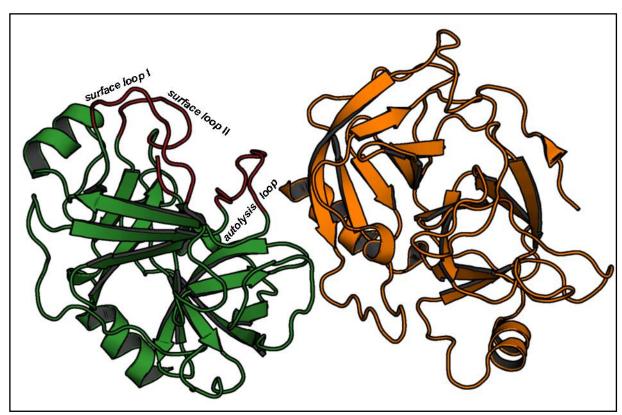


Abbildung 3.19: Orientierung des b-Trypsiligase-Moleküls zu seinem symmetrieverwandten Molekül (Koordinaten: $x - \frac{1}{2}$; -y - $\frac{1}{2}$, -z) in der Kristallform III. Das b-Trypsiligase-Molekül (Cartoondarstellung in grün) besitzt in der Aktivierungsdomäne (Cartoondarstellung in rot) Kristallkontakte zu seinem symmetrieverwandten Molekül (Cartoondarstellung in orange).

Die Analyse der Positionen der in b-Trypsiligase eingeführten Histidinreste His143 und His151 zeigt, dass eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Nε2-Atom von His153 zum Nζ-Atom des Lys87 im symmetrieverwandten Molekül (als Lys87# bezeichnet) mit einer Distanz von 3,25 Å möglich wäre. Die Reste der *surface loops* I und II sind in die Interaktion zu dem symmetrieverwandten Molekül nicht involviert.

Da Trypsiligase mit den zwei Histidinresten 143 und 151 eine artifizielle Metallbindestelle besitzt (Brinen *et al.*, 1996) und die Hydrolyse- wie auch die Ligationsaktivität abhängig von Zn²⁺-Ionen sind (Liebscher, 2007; Sharkhuukhen, 2009), sollten die b-Trypsiligase-Kristalle der Kristallform III mit Zn²⁺-Ionen "*gesoakt*" werden. Dazu wurden die gewachsenen Kristalle aus dem Kristallisationstropfen (0,1 M Tris-HCl, 20% (w/v) PEG 4000, 0,2 M Li₂SO₄, pH 8,5), welcher kein ZnCl₂ enthielt, gefischt und in einen neuen Kristallisationstropfen, der aus der identischen Kristallisationslösung zuzüglich 1 mM ZnCl₂ bestand, überführt. Die Kristalle wurden anschließend für 18 h in dieser Lösung inkubiert und danach mittels Röntgenkristallstrukturanalyse analysiert. Mit dieser Strategie konnten die Probleme, die bei der Kristallisation in Gegenwart von Zinkkonzentrationen höher 100 μM auftraten, umgangen werden. Die Aggregation der Proteine bzw. die Präzipitation in den

Ansätzen der Kristallisation in Gegenwart von Zn²⁺-Ionen ist dabei dem basischen pH-Wert geschuldet, da bereits bekannt ist, dass Metallionen bei pH-Werten höher 7,5 Reaktionen mit den Hydroxylionen eingehen und somit auch andere Messungen stören (Hanlon *et al.*, 1966). Ein Kristall der Kristallform III von b-Trypsiligase mit ZnCl₂ konnte bis zu einer maximalen Auflösung von 1,30 Å integriert und skaliert werden, wobei die Statistik der Datensammlung und die Parameter der Strukturverfeinerung im Anhang A.7 aufgelistet sind. Im Vergleich zu b-Trypsiligase (Kristallform III) ohne ZnCl₂ weist die Struktur mit ZnCl₂ einen RMSD-Wert für die Cα-Atome von 0,141 Å auf. Dieser Wert und der RMSD-Wert für alle Proteinatome der zwei Strukturen von 0,3 Å implizieren, dass durch den Zusatz von Zn²⁺-Ionen kaum konformationelle Änderungen in der Kristallform III von b-Trypsiligase auftreten. Auch die Interaktion von b-Trypsiligase mit dem symmetrieverwandten Molekül ändert sich kaum. Die Interaktionsfläche ist mit 547 Å² etwas gesunken, wohingegen die neun Wasserstoffbrücken unverändert vorhanden sind (Anhang A.6).

Bei der Betrachtung der artifiziellen Metallbindestelle in der Struktur in Gegenwart von ZnCl₂ war eine 2Fo-Fc Elektonendichte sowie eine positive Fo-Fc Differenzelektronendichte zu erkennen, die in der Struktur ohne Zn²⁺-Ionen nicht vorhanden sind (Abbildung 3.20 B).

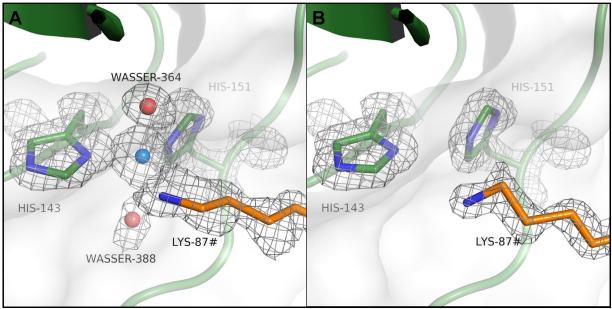


Abbildung 3.20: Metallbindestelle in der Kristallform III von b-Trypsiligase mit der 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter). Darstellung der Struktur von b-Trypsiligase A: nach ZnCl₂-soak über 18 h, B: ohne ZnCl₂ im Kristallisationspuffer. Das Zn²⁺-Ion ist als hellblaue Kugel dargestellt. In Stabdarstellung sind die Seitenketten von His143 und His151 (C-Atome grün, N-Atome blau) von b-Trypsiligase sowie von Lys87# (C-Atome orange, N-Atome blau) aus dem symmetrieverwandten Molekül gezeigt. Die Wassermoleküle 364 und 388, welche sich in der Umgebung vom Zn²⁺-Ion befinden, sind als rote Kugeln gezeigt.

Diese Elektronendichte wurde als Zn²⁺-Ion interpretiert und nach der Verfeinerung der Struktur mittels REFMAC5 war keine negative Fo-Fc Differenzelektronendichte an dieser

Position zu erkennen. Ebenso wurde eine anomale Elektronendichtekarte (λ = 0,918 Å) berechnet, die bei einem Kontur-Level > 3 σ einzig an der Position des Zn²⁺-Ions ein Signal aufweist. Dies weist auf ein anomal streuendes Atom wie z. B. ein Zn²⁺-Ion hin. Bei der gemessenen Wellenlänge kann jedoch nicht zwischen Atomen bzw. Ionen, welche ein anomales Signal besitzen unterschieden werden. Aufgrund des *soaks* mit ZnCl₂ erscheint der Einbau eines Zn²⁺-Ions jedoch plausibel. Ein *occupancy refinement* im Programm PHENIX führte zu einem finalen Besetzungsgrad von 0,76 für das Zn²⁺-Ion.

Wie die Struktur von b-Trypsiligase mit Zn²⁺-Ion zeigt (Abbildung 3.20 A), besteht die Möglichkeit, dass das Metallion mit drei Aminosäureresten und zwei Wassermolekülen interagiert und somit an der Position komplexiert wird. Weiterhin ist ersichtlich, dass das Lys87# während der Zinkbindung die Ausrichtung seiner Nζ-Gruppe hin zum Zn²⁺-Ion ändert. Dieser Hinweis auf die Komplexierung eines Zn²⁺-Ions durch Lys87# ist insofern interessant, als dass Lysine (Anzahl: 45, http://mespeus.bch.ed.ac.uk/MESPEUS/) bisher kaum dafür bekannt sind, in eine Zinkkomplexierung involviert zu sein.

Tabelle 3.1: Abstände vom Zn²⁺-Ion zu seinen Interaktionspartnern.

Interaktionspartner des Zn ²⁺ -Ions	Abstand zu Zn ²⁺ -Ions (Å)
Nδ1-Atom von His143	2,01
Nε2-Atom von His151	1,99
O-Atom von Wasser364	2,05
O-Atom von Wasser388	2,57
Nζ-Atom von Lys87#	1,98

Die Abstände zwischen dem Zn²⁺-Ion und den komplexierenden funktionellen Gruppen liegen zwischen 2,0 und 2,6 Å (Tabelle 3.1). Der Vergleich der Abstände des Zn²⁺-Ions zu seinen Interaktionspartnern in der Kristallform III von b-Trypsiligase mit Abständen von Zn²⁺-Ionen aus anderen Strukturen zu deren Interaktionspartnern mit dem MESPEUS-Servers (http://mespeus.bch.ed.ac.uk/MESPEUS/) zeigt, dass diese sehr gut mit den Abständen von bereits bekannten Zn²⁺-Metallbindungen korrelieren. So wurden bereits minimale Abstände von 1,77 Å bzw. maximale Abstände von 2,95 Å für eine koordinative Zinkbindung beobachtet (Tao *et al.*, 1997; Holtz *et al.*, 1999).

Für die Bindepartner des Zn²⁺-Ions ist jedoch zu beachten, dass die 2Fo-Fc Elektronendichte um das Wassermolekül 388 relativ schwach ist, wodurch nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass sich an dieser Position ein Wassermolekül befindet. Falls das Zn²⁺-Ion mit allen Molekülen (His143, His151, Lys87#, Wasser364 und Wasser388), die in

die Elektronendichte gebaut wurden, interagiert, würde die Koordinationszahl 5 sein. Damit verbunden und wie in Abbildung 3.20 A ersichtlich, würde das Zn²⁺-Ion trigonal-bipyramidal komplexiert werden. Dabei nehmen die Wassermoleküle 364 und 388 die Eckpunkte der Doppelpyramide und damit verbunden die axiale Ligandenposition ein. Die drei Aminosäurereste His141, His153 und Lys87# bilden die dreieckige Grundfläche und damit die äquatorialen Liganden. Die idealen Bindungswinkel zwischen den äquatorialen Liganden betragen jeweils 120° und zwischen den äquatorialen und den axialen Liganden jeweils 90°.

Tabelle 3.2: Bindungswinkel der Interaktionspartnern die das Zn²⁺-Ion einschließen.

Winkel einschließende Atome der Interaktion	Bindungswinkel (°)
Nδ1-His143 Zn ²⁺ Nε2-His151	116,75
Nδ1-His143 Zn ²⁺ Nζ-Lys87#	113,62
Nδ1-His143 Zn ²⁺ O-Wasser364	96,16
Nδ1-His143 Zn ²⁺ O-Wasser388	81,22
Nε2-His151 Zn ²⁺ Nζ-Lys87#	118,02
Nε2-His151 Zn ²⁺ O-Wasser364	100,76
Nε2-His151 Zn ²⁺ O-Wasser388	89,47
O-Wasser364 Zn ²⁺ Nζ-Lys87#	107,39
O-Wasser388 Zn ²⁺ Nζ-Lys87#	64,98

Wenn das Wasser388 nicht vorhanden wäre und somit auch keine Bindung zum Zn²⁺-Ion bestehen würde, wäre das Zn²⁺-Ion nur noch durch vier Liganden (His143, His151, Lys87# und Wasser364) komplexiert. Die Koordinationszahl würde sich auf 4 reduzieren und das Zn²⁺-Ion würde in einer Tetraederform gebunden werden, wobei es wiederum das Zentralatom darstellt. Die Bindungswinkel zwischen den vier Liganden, die die Ecken des Tetraeders darstellen, würden in diesem Fall 109,5° betragen. Die in der Tabelle 3.2 aufgelisteten Bindungswinkel für die Zinkkomplexierung in der b-Trypsiligase aus der Kristallform III weichen dabei von den idealen Werten für die zwei möglichen Anordnungen ab, so dass keiner der beiden Bindemodi ausgeschlossen bzw. bestätigt werden kann.

3.2.1.3 r-Trypsiligase Kristallform IV

Die Kristallisation von r-Trypsiligase (anionisches Rattentrypsin) zeigt im Vergleich zum b-Trypsiligase (kationisches Rindertrypsin) unter gleichen Kristallisationsbedingungen ein andersartiges Kristallwachstum (Abbildung 3.21 und Abbildung 3.7 A). Dabei bildet r-Trypsiligase sehr dünne, zerbrechliche Plättchenkristalle, wobei diese Plättchen miteinander

verwachsen sind (Abbildung 3.21 A und B). Dieses Kristallisationsverhalten wurde bereits in vorherigen Untersuchungen beobachtet und machte aufgrund der niedrigen Auflösungen der Kristalle durch das Vorhandensein mehrerer Kristallgitter bzw. eine Röntgenkristallstrukturanalyse unmöglich. Es gelang jedoch, die Kristallisation durch die Zugabe eines weiteren Additivs wie unter 2.8.1 beschrieben (1,3-Butandiol mit einer finalen Konzentration von 0,4 M im Kristallisationstropfen zu 0,1 M HEPES-NaOH, 0,1 M $(NH_4)_2SO_4$, 20% (w/v) PEG 4000, pH 7,3) so zu optimieren, dass einige dieser Plättchenkristalle einzeln gewachsen sind (Abbildung 3.21 C) und eine Strukturaufklärung zuließen.

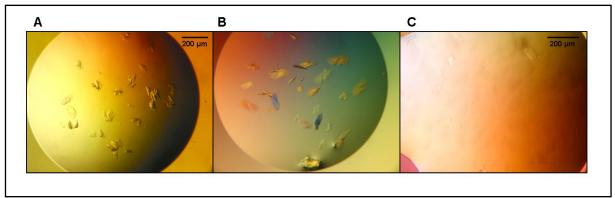


Abbildung 3.21: Kristalle von r-Trypsiligase. Kristalle von r-Trypsiligase gewachsen in A und B: 0,1 M HEPES-NaOH, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 20% (w/v) PEG 4000, pH 7,3 und C: 0,1 M HEPES-NaOH, 0,1 M (NH₄)₂SO₄, 20% (w/v) PEG 4000, 0,4 M 1,3-Butandiol, pH 7,3 (Kristallform IV, C2).

Ein Datensatz eines Kristalls von r-Trypsiligase, dessen Statistik der Datensammlung sowie die Parameter der Strukturverfeinerung im Anhang A.8 aufgeführt sind, konnte bis zu einer Auflösung von 2,3 Å integriert und skaliert werden. Der Kristall von r-Trypsiligase ist in der monoklinen Raumgruppe C2 (Kristallform IV, $a=143,33;b=42,71;c=99,67;\alpha=90^\circ;\beta=130,82^\circ;\gamma=90^\circ)$ gewachsen. Die Lösung des Phasenproblems für die Kristallform IV der r-Trypsiligase wurde wie unter 2.8.3 beschrieben durch MR mit Hilfe des Modells mit dem PDB-Code 3FP8 (Zakharova *et al.*, 2009) durchgeführt. Dabei konnten nach dem MR zwei Moleküle von r-Trypsiligase in der asymmetrischen Einheit identifiziert werden. Die Struktur konnte mit dem Programm PHENIX verfeinert werden, wobei die Rotations- und Translationsfunktionen der "nicht-kristallographischen Symmetrie" (NCS) angewendet wurde.

Abbildung 3.22 zeigt die Orientierung der zwei Momomere von r-Trypsiligase, die sich in der asymmetrischen Einheit befinden. Dabei wird deutlich, dass die Monomere durch die gleiche Seite miteinander angelagert sind, so befindet sich z. B. die C-terminale α -Helix an den äußeren Seiten der Monomere. In der Kristallform IV konnte die Elektronendichte für alle

Reste außer für AS 74 - 80 in der Kette A und AS 75 - 80 in der Kette B identifiziert werden. Diese fehlenden Regionen entsprechen Teilen der Calcium-Bindestelle (siehe 1.5.1).

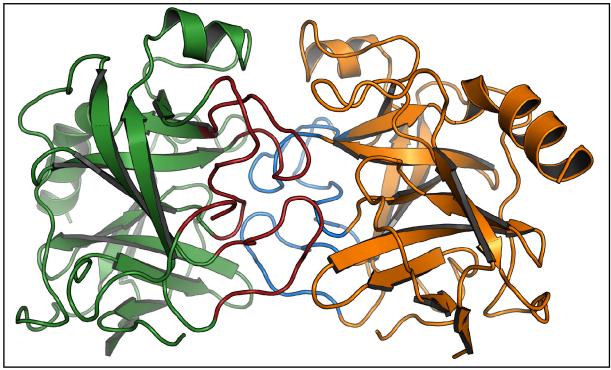


Abbildung 3.22 Cartoondarstellung der zwei Monomere von r-Trypsiligase als asymmetrischen Einheit der Kristallform IV. Die zwei Monomere von r-Trypsiligase, die in der Kristallform IV als asymmetrische Einheit zu finden sind, sind in grün (Kette A) und orange (Kette B) dargestellt. Die entsprechenden Segmente der Aktivierungsdomäne der Kette A sind in rot und von der Kette B in blau eingefärbt.

Eine Anordnung analog der zwei r-Trypsiligase-Moleküle in der asymmetrischen Einheit wurde bereits für die Rattentrypsin-Variante Asp189Ser in der monoklinen Raumgruppe P2₁ ($a = 45,92; b = 49,79; c = 89,88; \alpha = 90^\circ; \beta = 97,34^\circ; \gamma = 90^\circ$) beschrieben (PDB-Code 1AMH, Szabo *et al.*, 1999). Der Vergleich der Strukturen von r-Trypsiligase und D189S-Trypsin zeigt, dass die Moleküle in den meisten Regionen identische Konformationen zeigen. Der RMSD-Wert für die C α -Atome für die Überlagerung beider Strukturen mit jeweils beiden Monomeren der asymmetrischen Einheit beträgt 1,16 Å.

Der Vergleich der einzelnen Ketten zwischen r-Trypsiligase und D189S-Trypsin miteinander zeigt, dass die Cα-Atome in den zwei Monomere der jeweiligen Struktur in den gleichen Regionen Unterschiede in ihren Positionen aufweisen (Abbildung 3.23). Dabei ist auffällig, dass neben den Segmenten der Aktivierungsdomäne (um die Aminosäurereste 150, 190 und 220) die größte Abweichung, mit RMSD-Werten für die Cα-Atome von maximal ca. 6,5 Å zwischen r-Trypsiligase und D189S-Trypsin im Bereich der Aminosäurereste Ser37 - His40 liegt. Diese verschiedenen Positionen der Aminosäurereste treten, wie in Abbildung 3.23 A und B ersichtlich, in beiden Monomeren auf und kann nicht durch die

Anordnung und Interaktion zu symmetrieverwandten Molekülen erklärt werden (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot int/pistart.html).

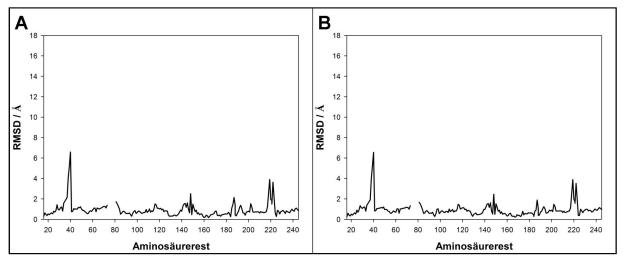


Abbildung 3.23: Vergleich der RMSD-Werte der Cα-Atome von r-Trypsiligase aus der Kristallform IV mit D189S-Trypsin (PDB-Code 1AMH, Szabo *et al.*, 1999). Es wurden die A: RMSD-Werte der Cα-Atome der Kette A von r-Trypsiligase und der Kette A von D189S-Trypsin, B: RMSD-Werte der Cα-Atome der Kette B von r-Trypsiligase und der Kette B von D189S-Trypsin gegen die entsprechenden Aminosäure aufgetragen. Für die Aminosäurereste Asn74 - Glu80 konnten keine Elektronendichten identifiziert werden, so dass keine RMSD-Werte für diese ermittelt werden konnten und sich in diesem Bereich Unterbrechungen in den Graphen befinden.

Hinsichtlich der Positionen der einzelnen Aminosäurereste unterscheiden sich die beiden Monomere von r-Trypsiligase kaum. So liegt der RMSD-Wert für die Cα-Atome der beiden r-Trypsiligase-Moleküle bei 0,141 Å und der für alle Atome, die sich in den beiden Ketten A und B befinden, bei 0,3 Å. Da die Monomere von r-Trypsiligase in der asymmetrischen Einheit der Kristallform IV fast identische Konformationen besitzen, wird im folgendem nur noch ein Monomer mit der internen Kettenbezeichnung "A" von r-Trypsiligase zu den Vergleichen herangezogen und dargestellt.

Die Höhe der RMSD-Werte (Abbildung 3.23) in der Region von Ser37 - His40 zwischen r-Trypsiligase und D189S-Trypsin kann möglicherweise durch die Einführung des Aminosäurerests Glutamat an der Position 60 erklärt werden. In Wildtyp-Rattentrypsin wie auch in D189S-Trypsin befindet sich an dieser Stelle ein Lysin (Abbildung 3.24 C), welches mit seiner lang gestreckten Seitenkette in Richtung des *loop*, welcher aus den Aminosäureresten Ser37 - His40 gebildet wird, ragt. Das Glutamat an der Position 60 könnte nun möglicherweise mehrere alternative Konformationen des *loop* 37 - 40 erlauben. Andererseits könnten allgemein alternative Konformationen der *loops* durch niedrige Energiebarrieren möglich sein, welche jedoch in den bekannten Kristallstrukturen noch nicht beobachtet werden konnten. Nichtsdestotrotz scheint es, dass die Konformation des *loop* 37 - 40, wie sie in der Kristallform IV der r-Trypsiligase vorliegt (Abbildung 3.24 B), in

D189S-Trypsin (Szabo *et al.*, 1999) durch das dort vorkommende Lys60 aufgrund sterischer Behinderung nicht eingenommen werden kann (Abbildung 3.24 C).

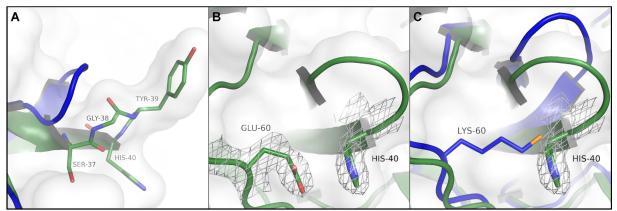


Abbildung 3.24: Orientierung des *loop* Ser37 - His40 in r-Trypsiligase im Vergleich zu D189S-Trypsin (PDB-Code 1AMH, Szabo *et al.*, 1999). A: Überlagerung der Aminosäurereste Ser37 - His40 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) von r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) und dem *loop* 37 - 40 aus D189S-Trypsin (Cartoondarstellung in blau), B: Seitenketten von Glu60 und His40 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit ihren 2Fo-Fc Elektronendichten (1 σ, graues Gitter) aus r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün), C: Seitenkette von His40 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit seiner 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) aus r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) und Seitenkette von Lys60 (Stabdarstellung, C-Atome blau, N-Atome orange) aus D189S-Trypsin (Cartoondarstellung in blau). Die Oberfläche von r-Trypsiligase ist weiß dargestellt.

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die Variante D189S-Trypsin durch die eingeführte Mutation eine deformierte S1-Bindetasche besitzt und sich somit vom Wildtyp-Trypsin strukturell unterscheidet (Szabo *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurden die Positionen der Cα-Atome von r-Trypsiligase wie bei den Strukturen von b-Trypsiligase mit der Struktur des aktiven Wildtyp-Enzyms verglichen. Für diesen Vergleich wurde die Struktur von Rattentrypsin mit dem PDB-Code 1DPO gewählt, bei der das Ser195 der katalytischen Triade zu einen Cys195 mutiert worden war (Earnest *et al.*, 1991), was die Sekundär- und Tertiärstruktur jedoch nicht beeinflusst. Dabei weisen die Cα-Atome für die Strukturen von r-Trypsiligase und S195C-Trypsin (PDB-Code 1DPO, Earnest *et al.*, 1991) einen RMSD-Wert von 2,32 Å auf. Beim Vergleich der r-Trypsiligase (Kristallform IV) mit S195C-Trypsin zeigt sich, dass neben dem bereits oben beschriebenen *loop* 37 - 40 die Segmente der Aktivierungsdomäne und vor allem ein Teil des *surface loop* II unterschiedliche Positionen aufweisen (Abbildung 3.25 A).

Im Vergleich zu der beschriebenen b-Trypsiligase der Kristallform III (3.2.1.2), welche in einem zymogenähnlichen Zustand vorliegt, weisen die Cα-Atome der r-Trypsiligase aus der Kristallform IV einen RMSD-Wert von 2,505 Å auf. Dabei zeigt sich, dass die RMSD-Werte der Cα-Atome in der Aktivierungsdomäne ähnlich hoch wie in der Abbildung 3.16 A, welche den Vergleich zwischen der b-Trypsiligase aus der Kristallform III und dem

Wildtyp-Rindertrypsin (PDB-Code 3MFJ) zeigt, sind. Aus diesem Vergleich wird ersichtlich, dass sich r-Trypsiligase (Kristallform IV) und b-Trypsiligase aus der Kristallform III in den Segmenten der Aktivierungsdomäne deutlich voneinander unterscheiden und dass r-Trypsiligase dem Zustand des Wildtyp-Trypsins ähnlicher ist.

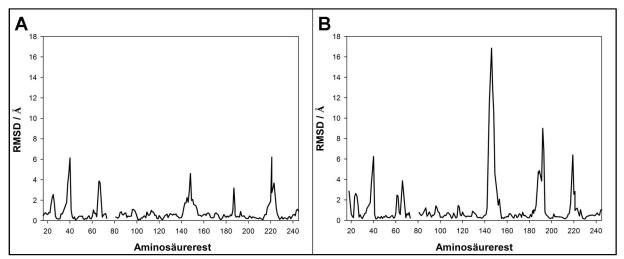


Abbildung 3.25: Vergleich der RMSD-Werte der Cα-Atome von r-Trypsiligase (Kristallform IV) mit A: S195C-Trypsin (PDB-Code 1DPO, Earnest *et al.*, 1991) bzw. B: b-Trypsiligase (Kristallform III, 3.2.1.2). Für die Aminosäurereste Asn74 - Glu80 konnten keine Elektronendichten identifiziert werden, so dass keine RMSD-Werte für diese ermittelt werden konnten und sich in diesem Bereich Unterbrechungen in den Graphen befinden.

Dieser Sachverhalt wird deutlicher, wenn man die Positionen der Cα-Atome des *autolysis loops* und der *surface loops* I und II aller drei Strukturen zusammen betrachtet (Abbildung 3.26).

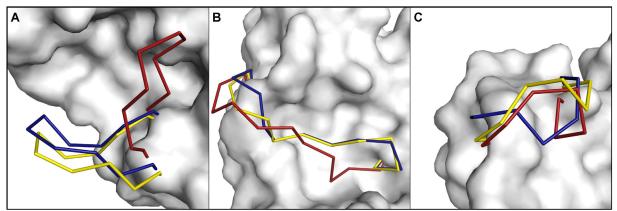


Abbildung 3.26: Überlagerung der Aktivierungsdomäne von r-Trypsiligase der Kristallform IV mit b-Trypsiligase der Kristallform III (3.2.1.2) und Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ). Dargestellt ist die fiktive Oberfläche (weiß) aller Aminosäurereste von Trypsiligase, die nicht zum *autolysis loop* oder den *surface loops* I und II gehören. In Bänderdarstellung ist in A: der *autolysis loop*, B: der *surface loop* I und C: der *surface loop* II von r-Trypsiligase der Kristallform IV (gelb), von b-Trypsiligase der Kristallform III (rot) und von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, blau) gezeigt. Zur Orientierung der Lage zwischen den drei *loops* siehe auch Abbildung 1.8.

So zeigen die *autolysis loops* in der Kristallform IV der r-Trypsiligase und in Wildtyp-Trypsin eine ähnliche Konformation (Abbildung 3.26 A, blau und gelb), wohingegen der *autolysis loop* in der Kristallform III von b-Trypsiligase wie bereits in Abbildung 3.15 A gezeigt eine Konformation einnimmt, die um etwa 90° umgeklappt ist (Abbildung 3.26 A, rot).

Die Orientierung der *surface loops* I und II von r-Trypsiligase ähnelt im Gegensatz zum *autolysis loop* mal mehr der Konformation von Wildtyp-Trypsin und mal mehr der Konformation von b-Trypsiligase aus der Kristallform III (Abbildung 3.26 B und C).

Bei der Betrachtung des Asp194 in der Kristallform IV wird der Befund, dass die Struktur von r-Trypsiligase der Struktur von Wildtyp-Trypsin ähnlicher ist und damit einer aktivähnlichen Konformation im Vergleich zur zymogenähnlichen b-Trypsiligase (Kristallform III) entspricht, bestätigt (Abbildung 3.27). So zeigt die Seitenkette von Asp194 in Richtung der Aminogruppe von Ile16 (N-Terminus), für das in r-Trypsiligase eine Elektronendichte identifiziert werden konnte (Abbildung 3.27 A). Wie der Vergleich zur Struktur von Wildtyp-Trypsin erkennen lässt (Abbildung 3.27 B), nehmen die Aminosäurereste Asp194 und Ile16 in r-Trypsiligase identische Positionen ein und es kommt zur Ausbildung der "begrabenen Salzbrücke" zwischen den beiden Resten.

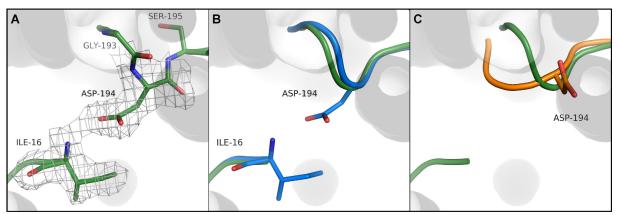


Abbildung 3.27: Konformationen von Asp194 und Ile16 aus der Kristallform IV von r-Trypsiligase im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin und Wildtyp-Trypsinogen. A: Asp194 und Ile16 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit ihrer 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) aus r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün), B: Überlagerung von r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, Cartoondarstellung in blau) und die Orientierung der Seitenketten von Asp194 und Ile16 (Stabdarstellung, C-Atome blau, N-Atome dunkelblau, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsin, C: Überlagerung von r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit Wildtyp-Trypsinogen (PDB-Code 1TGB, Cartoondarstellung in orange, Fehlhammer *et al.*, 1977) und die Orientierung der Seitenkette von Asp194 (Stabdarstellung, C-Atome orange, O-Atome rot) in Wildtyp-Trypsinogen.

Die Analyse der Interaktionsfläche zwischen den beiden r-Trypsiligase-Monomeren in der asymmetrischen Einheit (siehe Abbildung 3.22) zeigt, dass diese eine Fläche von 1516,8 Å2 besitzt. Die Interaktionsfläche ist somit im Vergleich zu der bereits bekannten Struktur von D189S-Trypsin (PDB-Code 1AMH, Szabo *et al.*, 1999), bei der die Monomere laut Analyse

mittels Pisa-Server (http://www.ebi.ac.uk/msd-srv/prot_int/pistart.html) über eine Fläche von 1077,6 Ų wechselwirken, um ca. ¹/₃ größer. Zwischen den zwei Monomeren von r-Trypsiligase bilden sich 18 Wasserstoffbrücken aus, wohingegen bei D189S-Trypsin nur 11 Wasserstoffbrücken auftreten (Anhang A.9). Dabei sind in der Kette A der r-Trypsiligase 42 Aminosäurereste und in der Kette B 43 Aminosäurereste in der Kontaktfläche zu finden (Abbildung 3.28). In der Struktur von D189S-Trypsin sind es 37 Aminosäurereste im ersten Monomer (Kette A) und 34 Aminosäurereste im zweiten Monomer (Kette B), welche miteinander wechselwirken. Im *autolysis loop* der Kristallform IV von r-Trypsiligase können His143 und Leu145 - His151 in der Kontaktfläche gefunden werden, wobei diese Aminosäurereste sechs Wasserstoffbrücken zu den Aminosäureresten im zweiten Monomer ausbilden. Aus dem *surface loop* I interagieren Glu186 - Gly188 und Cys191 - Gly193 (eine Wasserstoffbrücke) mit dem zweiten Monomer von r-Trypsiligase und im *surface loop* II befinden sich die Gly216 - Asn224, die wiederum zwei Wasserstoffbrücken zum zweiten Monomer ausbilden, in der Kontaktfläche.

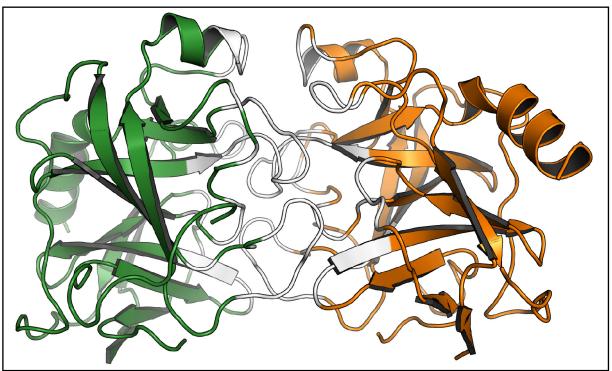


Abbildung 3.28: Cartoondarstellung der Interaktionsfläche zwischen den Ketten A und B von r-Trypsiligase. Die beiden Monomere von r-Trypsiligase sind in grün (Kette A) und orange (Kette B) dargestellt. Die Aminosäurereste beider Monomere, die in die Kontaktfläche involviert sind, sind weiß dargestellt.

Bei der Betrachtung der in r-Trypsiligase substituierten Aminosäurereste konnte die Ausrichtung des Glutamats an der Position 60 bereits gezeigt werden (Abbildung 3.24 B). His 143 und 151, die die artifizielle Metallbindestelle bilden, zeigen in der Nachbarschaft eine

Elektronendichte, in die ein Zn²⁺-Ion interpretiert werden konnte (Abbildung 3.29 A). Es scheint dabei, dass in der Kristallform IV der r-Trypsiligase ohne zusätzliche Zugabe von ZnCl₂ ein Zn²⁺-Ion an der entsprechenden Metallbindestelle gebunden ist. Dabei ist bei der Betrachtung der beiden Monomere, die in der asymmetrischen Einheit auftreten, zu erkennen, dass die vier Histidinreste ein gemeinsames Zn²⁺-Ion komplexieren. Die Dimerisierung von r-Trypsiligase führt somit zu einer Metallbindestelle für zwei Monomere (Abbildung 3.29 A).

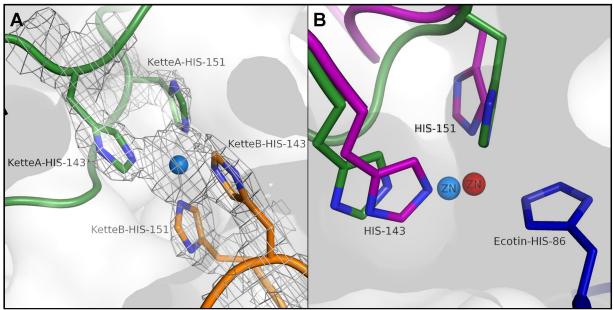


Abbildung 3.29: Metallbindestelle in der Kristallform IV von r-Trypsiligase. A: Position der Metallbindestelle in der Interaktionsfläche zwischen der Kette A (Cartoondarstellung in grün) und der Kette B (Cartoondarstellung in orange) der Kristallform IV von r-Trypsiligase. Gezeigt ist das Zn²+-Ion (blaue Kugel) und die es komplexierenden Histidine 143 und 151 von Kette A (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau) und Kette B (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau) mit deren 2Fo-Fc Elektronendichten (1 σ, graues Gitter). B: Überlagerung der Kette A von r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün) mit dem Komplex aus N143H/E151H-Trypsin (Cartoondarstellung in lila) und A86H-Ecotin (Cartoondarstellung in blau) (PDB-Code 1SLX, Brinen *et al.*, 1996). Gezeigt sind die jeweils das Zn²+-Ion (r-Trypsiligase: blaue Kugel, Zn²+-Ion aus 1SLX: rote Kugel) komplexierenden Reste aus der Kette A von r-Trypsiligase (Cartoondarstellung in grün, Stabdarstellung der Seitenketten von His143 und His151 mit C-Atome blau) und dem Komplex aus N143H/E151H-Trypsin (Cartoondarstellung in lila, Stabdarstellung der Seitenketten von His143 und His151 mit C-Atome blau) und A86H-Ecotin (Cartoondarstellung in blau, Stabdarstellung der Seitenkette von His86 mit C-Atome blau, N-Atome hellblau).

Die Komplexierung des Zn²⁺-Ions in der Metallbindestelle durch die vier Liganden führt ebenso zu Kontakten zwischen den Monomeren und damit verbunden zu Interaktionen an den Substratbindetaschen von r-Trypsiligase, wie die oben beschriebene Dimerisierung. Die Interaktion am Zn²⁺-Ion in der Kristallform IV der r-Trypsiligase ähnelt dem Zustand der Substratbindung. Dabei ist neben den beiden Histidinresten in Trypsiligase ein dritter Histidinrest in der YRH-Sequenz des Substrats als Ligand mit dem Zn²⁺-Ion komplexiert (Abbildung 3.29 B). Die Überlagerung der Metallbindestelle der Kette A von r-Trypsiligase aus der Kristallform IV mit der aus dem Komplex von N143H/E151H-Trypsin und dem

Inhibitor A86H-Ecotin (Brinen *et al.*, 1996) zeigt, dass die Ausrichtung der Liganden sowie die Lage des Zn²⁺-Ions recht ähnlich sind (Abbildung 3.29 B). Dies stützt die Aussage, dass r-Trypsiligase in der Kristallform IV in einem Zustand ähnlich der Substratbindung vorliegt, da der Inhibitor A86H-Ecotin im überlagerten Komplex ein Pseudo-Substrat darstellt (siehe 1.3). Einen potentiellen vierten Ligand für das Zn²⁺-Ion stellt möglicherweise ein Wassermolekül dar, welches in den bisherigen strukturellen Untersuchungen dieser artifiziellen Metallbindestelle in Trypsin nur für die Metallionen Cu²⁺ und Ni²⁺ nachgewiesen werden konnte (Brinen *et al.*, 1996).

Die für die Zn²⁺-Komplexierung ermittelten Abstände von 2,1 Å bis 2,27 Å (Abbildung 3.30, Anhang A.10) zwischen den vier Histidineresten und den Zn²⁺-Ion stimmen mit denen für die in der Kristallform III von b-Trypsiligase (Tabelle 3.1) erhaltenen und den aus der Literatur bekannten Werten überein (http://mespeus.bch.ed.ac.uk/MESPEUS/).

Hinsichtlich der Winkel, welche das Zn²⁺-Ion einschließen (Abbildung 3.30, Anhang A.10), zeigt sich, dass die Komplexierung durch beide Monomere in einer identischen Anordnung stattfindet. So beträgt der Winkel zwischen Nε2-His143--Zn²⁺--Nε2-His151 in der Kette A 112,8° und in der Kette B 112,1°. Dagegen weist dieser Winkel bei der Inhibitorbindung (Pseudo-Substrat) einen Wert von 93,17° auf (siehe Abbildung 3.51 B, Brinen *et al.*, 1996).

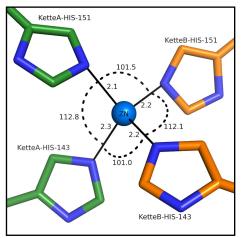


Abbildung 3.30: Abstände und Bindungswinkel zwischen dem Zn²⁺-Ion und seinen Interaktionspartnern in der Kristallform IV von r-Trypsiligase. Dargestellt ist das Zn²⁺-Ion (blaue Kugel) und die Seitenketten der Histidine 143 und 151 aus der Kette A (C-Atome grün, N-Atome blau) und der Kette B (C-Atome orange, N-Atome blau) sowie die Abstände (in Å, mit —) zwischen dem Zn²⁺-Ion und den Interaktionspartnern. Die das Zn²⁺-Ion einschließenden Bindungswinkel der Interaktionspartner (in °) sind mit - - - - dargestellt.

Für das im *surface loop* I lokalisierte Lys189 konnte in r-Trypsiligase der Kristallform IV im Gegensatz zu b-Trypsiligase der Kristallform III (Abbildung 3.18 C) für alle Atome der Seitenkette eine Elektronendichte detektiert werden (Abbildung 3.31 A). Durch die Substitution des Lys189 und die im Vergleich zum S195C-Trypsin (Wildtyp-Konformation, PDB-Code 1DPO, Earnest *et al.*, 1991) andersartige Konformation der Seitenkette

(Abbildung 3.31) wird die S1-Bindetasche in r-Trypsiligase größer (Abbildung 3.31 A). Es kommt wie für andere Trypsin-Varianten, in denen Asp189 mutiert wurde (z. B. D189S-Trypsin, Szabo *et al.*, 1999), zur Deformierung der S1-Bindetasche, was bereits beim Vergleich der RMSD-Werte der Cα-Atome zwischen r-Trypsiligase und S195C-Trypsin (Wildtyp-Konformation, Earnest *et al.*, 1991) deutlich wurde (Abbildung 3.25).

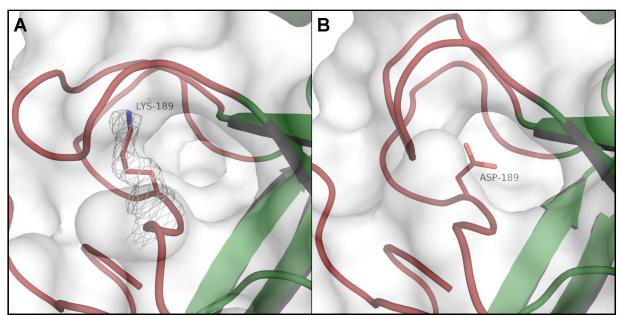


Abbildung 3.31: Vergleich der S1-Bindetasche zwischen r-Trypsiligase (Kristallform IV) und S195C-Trypsin (Wildtyp-Konformation, PDB-Code 1DPO, Earnest *et al.*, 1991)). A: S1-Bindetasche mit der Seitenkette von Lys189 (Stabdarstellung, C-Atome rot, N-Atome blau) und seiner 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) in der Kristallform IV von r-Trypsiligase und die umgebenden Segmente der Aktivierungsdomäne (Cartoondarstellung, rot). B: S1-Bindetasche mit der Seitenkette des Asp189 (Stabdarstellung, C-Atome rot, O-Atome rosa) in C195S-Trypsin (PDB-Code 1DPO, Earnest *et al.*, 1991) und die umgebenden Segmente der Aktivierungsdomäne (Cartoondarstellung, rot). Die Oberfläche der Proteine ist weiß dargestellt.

Die Ausbildung der S1-Bindetasche ist ein weiteres Indiz dafür, dass die r-Trypsiligase in der Kristallform IV in seiner dimerisierten Form einer aktivähnlichen Konformation entspricht. Die Analyse der Ausrichtung der Reste 189 in der Kristallform IV von r-Trypsiligase und S195C-Trypsin (Wildtyp-Konformation, Earnest *et al.*, 1991) und ihren Interaktionspartnern zeigt ebenso die andersartige Konformation der S1-Bindetasche in r-Trypsiligase (Abbildung 3.32). So bildet das Oδ2-Atom von Asp189 in S189C-Trypsin eine Wasserstoffbrückenbindung zum Amidstickstoff von Ala221 aus, wohingegen diese in r-Trypsiligase aufgrund der Nζ-Gruppe des Lys189 nicht ausgebildet werden kann. Dies ist möglicherweise der Grund der veränderten Position von Ala221 in der Kristallform IV der r-Trypsiligase im Vergleich zu S195C-Trypsin (Earnest *et al.*, 1991), was in einem RMSD-Wert für das Cα-Atom von ca. 6 Å resultiert. Eine Interaktion, die in der S1-Bindetasche von r-Trypsiligase vorhanden ist, jedoch nicht in S195C-Trypsin, ist die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonylsauerstoffatom von Leu221A und der

Lys189-Nζ-Gruppe. Dies zeigt wiederum, dass durch neue Interaktionen zwischen dem Lys189 und den Aminosäureresten der S1-Bindetasche in Trypsiligase ebenso Veränderungen in der Lage der Aminosäurereste im Vergleich zur Wildtyp-Konformation zustande kommen, was zur Deformierung der Substratbindetasche führt.

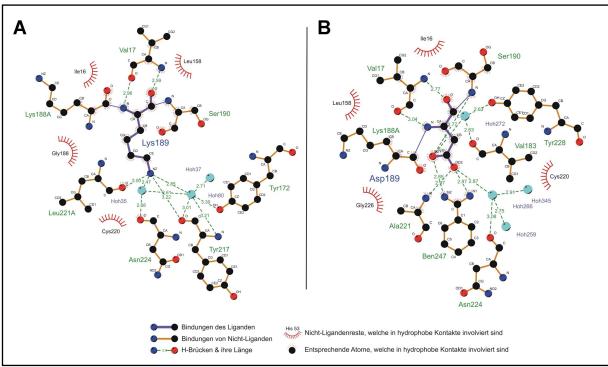


Abbildung 3.32: Interaktionen von Lys189 aus der Kristallform IV von r-Trypsiligase und Asp189 aus S195C-Trypsin (Wildtyp-Konformation, PDB-Code 1DPO, Earnest *et al.*, 1991) mit den umgebenden Aminosäureresten und Solvensmolekülen. A: Ligplot von Lys189 aus der Kristallform IV von r-Trypsiligase. B: Ligplot von Asp189 aus S195C-Trypsin (PDB-Code 1DPO, Earnest *et al.*, 1991).

Bei der Analyse der Interaktionen in r-Trypsiligase und S195C-Trypsin (Abbildung 3.32) ist jedoch zu beachten, dass S195C-Trypsin in Gegenwart von Benzamidin (Benz247 in Abbildung 3.32 B), das ein Trypsininhibitor darstellt und in der S1-Bindetasche lokalisiert ist, kristallisiert wurde. Dadurch können Interaktionen, die im inhibitor- und substratfreien Zustand, wie das in der Kristallform IV von r-Trypsiligase der Fall ist, vorhanden sind, ebenso durch Interaktionen mit dem Inhibitor ersetzt sein und somit in den Analysen nicht auftauchen.

3.2.2 Interaktionsstudien von Trypsiligase mit Eglin C-Varianten

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern die Bindung von Substraten oder Inhibitoren die Strukturen bzw. r-Trypsiligase beeinflussen. Die von b-Kristallisationsversuche mit der inaktiven Variante S195A-b-Trypsiligase in Gegenwart der für die Aktivitätsmessungen verwendeten Peptidsubstrate (z. B. Bz-AAYRHAAG-OH) oder deren Hydrolyseprodukte (z. B. RHAAG-OH) waren erfolglos, da keine Kristalle wuchsen oder nur die ligandfreien Strukturen (3.2.1) erhalten wurden. Aus diesem Grund sollte eine Kokristallisation mit einem makromolekularen Inhibitor erfolgen, welcher die von Trypsiligase für die Hydrolyse bevorzugte YRH-Sequenz bzw. Teile dieser in seinem reactive site loop (1.3) beinhaltet. Für die Kokristallisationsversuche sollte das ursprünglich als Chymotrypsin-Inhibitor fungierende Eglin C aus dem Blutegel Hirudo medicinalis verwendet werden (Seemüller et al., 1977; Seemüller et al., 1980). Durch ortsgerichtete Mutagenese des Leu45 zu Arg oder Lys wurde die inhibitorische Wirkung von Eglin C auf Trypsin übertragen (Heinz et al., 1992; Menzel, 2009; Hellwig, 2011). Aufgrund des für die Inhibierung essentiellen Aminosäurerestes Asp46 (Heinz et al., 1992), welcher den P1'-Rest des reactive site loop darstellt, konnte die vollständige YRH-Sequenz nicht in Eglin C substituiert werden. Durch ortsgerichtete Mutagenese, bei der Teile der von Trypsiligase erkannten und proteolytisch zu spaltenden YRH-Sequenz in den reactiv site loop substituiert wurden, sollten mögliche Inhibitoren zur Kokristallisation mit Trypsiligase erzeugt werden.

Die Stabilität möglicher Trypsiligase-Eglin C-Komplexe bzw. die Affinität der Bindepartner sollte qualitativ und quantitativ durch Interaktionsstudien untersucht werden, damit ein möglichst stabiler Komplex zur Kokristallisation eingesetzt werden konnte.

Des Weiteren sollte durch Analysen mittels analytischer Ultrazentrifugation der Frage nachgegangen werden, ob das in der Kristallform IV (3.2.1.3) erhaltene Dimer von r-Trypsiligase in der asymmetrischen Einheit durch Kristallkontakte hervorgerufen ist, oder ob diese Dimerisierung bereits in Lösung vorliegt?

3.2.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese der Eglin C-Varianten

Die Mutationen der Varianten L45A/L47H-Eglin C und L45Y/L47H-Eglin C wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese wie unter 2.2.1 beschrieben aus L45K-Eglin C erzeugt. Das Bild der Agarosegel-Elektrophorese für L45A/L47H-Eglin C zeigt, dass in Bahn 1 eine deutliche Bande in Höhe der 6000 bp-Bande der 1-kb-DNA-Leiter zu erkennen ist. Der Vektor mit dem

entsprechenden Eglin C-Gen besitzt 5919 Basenpaare. Bei der zweiten Bande in Bahn 1, die weit unter der Markerbande von 500 bp läuft, handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um überschüssige Oligonukleotide im Ansatz.

Durch die Sequenzanalysen konnten Klone, welche die entsprechende Mutation enthielten, identifiziert werden, so dass neben der bereits vorhandenen L45K-Eglin C-Variante die Varianten L45A/L47H-Eglin C und L45Y/L47H-Eglin C generiert werden konnten.

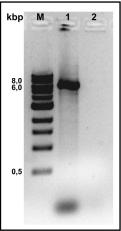


Abbildung 3.33: Agarosegel des L45A/L47H-Eglin C **PCR Ansatzes.** M: 1-kb-DNA-Leiter, 1: PCR-Ansatz von L45A/L47H-Eglin C, 2: Kontrolle des PCR-Ansatzes ohne dNTP-Mix.

3.2.2.2 Genexpression und Reinigung der Eglin C-Varianten

Die Genexpression der Eglin C-Varianten wurde wie unter 2.4.1 beschrieben in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen durchgeführt. Der Zellaufschluss der Proben vor und nach der Induktion mit IPTG zeigt (Abbildung 3.34 A) nach der Induktion eine Proteinbande auf der für Eglin C zu erwartenden Höhe (10,3 kDa). Dies deutet auf die erfolgreiche Überexpression der entsprechenden Eglin C-Varianten hin.

Die geernteten Zellen wurden wie unter 2.4.2 beschrieben aufgeschlossen und die löslich exprimierten Eglin C-Varianten wurden anschließend mittels Affinitätschromatographie an einer Nickelsäule (2.4.3) gereinigt. Die SDS-PAGE der Durchfluss- und Elutionsfraktionen verdeutlicht (Abbildung 3.34 B), dass das vor der Reinigung in Lösung befindliche Eglin C (Bahn 3) an die Säule bindet, da nach der Säule auf der Höhe des Eglin C keine Bande mehr in der Lösung zu erkennen ist (Bahn 4). Bahn 5 zeigt die Elutionsfraktion bei einer Konzentration von 60% Laufpuffer B, wobei die entsprechende Eglin C-Variante in hoher Reinheit erhalten werden konnte.

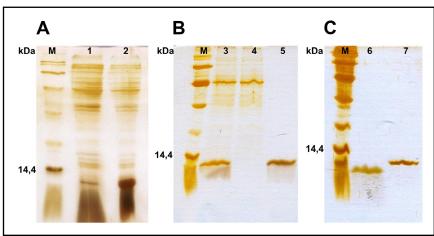


Abbildung 3.34: Herstellung der Eglin C-Varianten. SDS-PAGE von A: der Genexpression von L45K-Eglin C (M: Molekulargewichtsstandard, 1: Zellen vor Zugabe von IPTG, 2: Zellen vor der Zellernte), B: der Affinitätschromatographie von L45K-Eglin C (M: Molekulargewichtsstandard, 3: Proteinlösung vor der Affinitätschromatographie, 4: Durchflussfraktionen, 5: Elutionsfraktionen bei 60% Laufpuffer B) und C: der Affinitätschromatographie von L45K-Eglin C nach der TEV-Spaltung (M: Molekulargewichtsstandard, 6: Durchflussfraktionen bei 0% Laufpuffer B, 7: L45K-Eglin C vor der TEV-Spaltung).

Wie in 2.4.3 beschrieben wurden die Eglin C-Varianten im Anschluss einer TEV-Spaltung unterzogen, um den N-terminalen His₆-tag vom reifen Protein abzuspalten. Dadurch sollten sie in der folgenden Affinitätschromatographie nicht mehr an die Nickelsäule binden. Der Erfolg dieser Strategie ist in Abbildung 3.34 C ersichtlich (His₆-tag-freies Eglin C in den Durchflussfraktionen, Bahn 6, mit geringerer molarer Masse im Vergleich zum Eglin C mit His₆-tag, Bahn 7). Die Korrektheit der jeweiligen molaren Masse konnte mittels Massenspektrometrie bestätigt werden (Daten nicht gezeigt), so dass mit der hier gewählten Strategie zur Reinigung alle Eglin C-Varianten diese in homogener Form mit den in Tabelle 3.3 aufgeführten Ausbeuten erhalten werden konnten.

Tabelle 3.3: Ausbeuten an gereinigten Eglin C, bezogen auf das Expressionsvolumen. * Daten aus Menzel (2009).

Eglin C-Variante	mg gereinigtes Protein (nach der	mg gereinigtes Protein (nach der	
	1.Affinitätschromatographie)	TEV-Spaltung) pro l	
	pro l Expressionskultur	Expressionskultur	
L45K-Eglin C *		7,5	
L45A/L47H-Eglin C	34,4 ±5,5	8,2 ±0,4	
L45Y/L47H-Eglin C	30,8 ±6,2	9,0 ±1,5	

Die angegebenen Ausbeuten stellen dabei den Mittelwert aus zwei bzw. drei Expressionen dar. Es ist zu erkennen, dass nach der TEV-Spaltung und der anschließenden Reinigung nur noch um die 30% des eingesetzten Proteins vorhanden ist. Da während der Dialyse gegen den TEV-Puffer und nach der Spaltung Aggregate erkennbar waren, kann der Verlust auf die reduzierenden Bedingungen während der TEV-Spaltung zurückgeführt werden.

3.2.2.3 Analyse der Interaktion von Trypsiligase und den Eglin C-Varianten mittels Gelfiltration

Wie unter 2.3.5 beschrieben kann die Methode der Gelfiltration benutzt werden, um Proteine nach ihrer molaren Masse aufzutrennen. Dabei können auch Interaktionen zwischen Makromolekülen untersucht werden, wenn diese stabile Komplexe bilden. Bei einer Interaktion zwischen Trypsiligase und den entsprechenden Eglin C-Varianten ist die molare Masse des Komplexes die Summe der molaren Massen der einzelnen Proteinkomponenten. Durch diese größere molare Masse eluiert der Proteinkomplex im Vergleich zu den kleineren Einzelkomponenten eher von der Gelfiltrationssäule.

Die Gelfiltration der erwarteten Komplexe wurde wie unter 2.7.1 beschrieben mit einem zehnfachen molaren Überschuss der entsprechenden Eglin C-Variante durchgeführt. Dabei zeigt das Chromatogramm von r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C zwei separate Elutionspeaks bei 168 ml und 237 ml (Abbildung 3.35 A). Die Analyse der Elutionsfraktionen mittels SDS-PAGE (Abbildung 3.35 B) ergab für Elutionsfraktion 1 sowohl r-Trypsiligase als auch L45Y/L47H-Eglin C, was für einen stabilen Komplex der beiden Proteine spricht. Elutionsfraktion 2 enthält ausschließlich L45Y/L47H-Eglin C, welches in Überschuss zugegeben worden war.

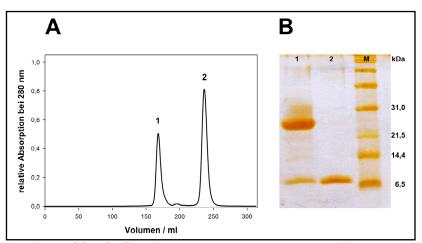


Abbildung 3.35: Gelfiltration des Komplexes aus r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C in Anwesenheit von 100 μM ZnCl₂. A: Chromatogramm der Gelfiltration (Elutionspeak 1 bei einer Retentionszeit von 168 min, Elutionspeak 2 bei einer Retentionszeit von 237 min) es wurde die Absorption bei 280 nm gegen das Ausschlussvolumen aufgetragen, B: SDS-PAGE der Elutionspeaks der Gelfiltration (M: Molekulargewichtsstandard, 1: Elutionspeak 1 bei 168 ml, 2: Elutionspeak 2 bei 237 ml).

Analoge Studien (Daten nicht gezeigt) für r-Trypsiligase mit L45K-Eglin C bzw. L45A/L47H-Eglin C und b-Trypsiligase mit den drei Eglin C-Varianten ergab, dass neben r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C (Abbildung 3.35) nur r-Trypsiligase und L45K-Eglin C einen unter diesen Bedingungen stabilen Komplex bilden (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Analyse der Interaktion zwischen Trypsiligase und Eglin C-Varianten mittels Gelfiltration. Die Analyse der Komplexbildung erfolgte wie unter 2.7.1 beschrieben. Die Position 45 in Eglin C entspricht der P1-Position des Substrats, Position 47 der P2'-Position.

Trypsiligase-Variante	Eglin C-Variante	Komplexbildung
r-Trypsiligase	L45K-Eglin C	Ja
	L45Y/L47H-Eglin C	Ja
	L45A/L47H-Eglin C	Nein
b-Trypsiligase	L45K-Eglin C	Nein
	L45Y/L47H-Eglin C	Nein
	L45A/L47H-Eglin C	Nein

Offenbar können die Eglin C-Varianten zwischen b-Trypsiligase und r-Trypsiligase diskriminieren, da nur für die anionische r-Trypsiligase Komplexe zu beobachten waren. Weiterhin scheint der P1-Rest (Position 45 in Eglin C) des Inhibitors eine stärkere Rolle für die Komplexbildung und damit verbunden für die Affinität zu spielen als der entsprechende P2'-Rest (Position 47 in Eglin C), denn L45K-Eglin C bildet einen Komplex mit r-Trypsiligase, obwohl sich an der P2'-Position die im Wildtyp-Eglin C vorkommende Aminosäurerest Leucin befindet und somit kein Histidin an der P2'-Position besitzt, wie es in der von Trypsiligase bevorzugten YRH-Spaltsequenz der Fall ist. Mit L45A/L47H-Eglin C, das an dieser Stelle einen für die artifizielle Metallbindestelle (Zn²⁺-Ion) erforderlichen Histidinrest enthält, tritt jedoch keine Komplexbildung zu r-Trypsiligase auf.

3.2.2.4 Analyse der Interaktion von Trypsiligase und den Eglin C-Varianten mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC)

Wie unter 2.7.2 beschrieben, kann die ITC genutzt werden um die Assoziation von Proteinen hinsichtlich ihrer Stöchiometrie, Assoziationskonstante, freien Energie, Enthalpie und Entropie zu quantifizieren. Die ITC-Messungen von r-Trypsiligase bzw. b-Trypsiligase wurden mit den drei Eglin C-Varianten (L45K, L45A/L47H oder L45Y/L47H) wie unter 2.7.2 beschrieben durchgeführt.

Für b-Trypsiligase konnte mit den vorhandenen Eglin C-Varianten weder mit noch ohne 100 μM ZnCl₂ aufgrund fehlender Plateaus vor und nach der Übergangskurve quantitativ auswertbaren Titrationskurven erhalten werden (Daten nicht gezeigt).

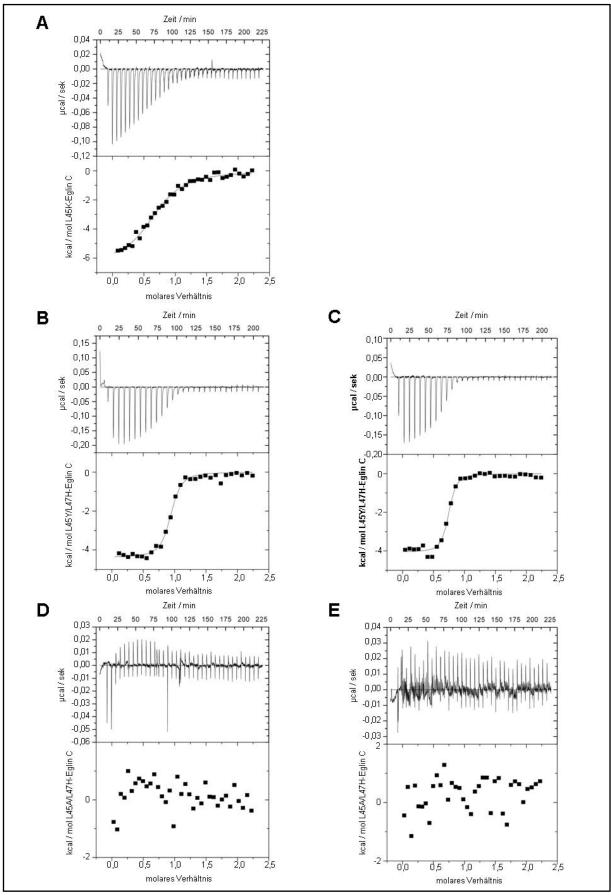


Abbildung 3.36: Kalorimetrische Titrationen für r-Trypsiligase mit den drei Eglin C-Varianten. Die ITC-Messung von r-Trypsiligase mit A: L45K-Eglin C, B und C: L45Y/L47H-Eglin C und D und E: L45A/L47H-Eglin C erfolgte wie unter 2.7.2 beschrieben. Die Graphen A, B und D zeigen die Messungen in Gegenwart von 100 μM ZnCl₂ und die Graphen C und E in Abwesenheit von ZnCl₂.

Die Interaktionsstudien zwischen r-Trypsiligase und L45K-Eglin C bzw. r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C zeigten auswertbare Titrationskurven (Abbildung 3.36 A, B und C). Im Gegensatz dazu ergab die Kombination von r-Trypsiligase mit L45A/L47H-Eglin C keine Wärmeänderung und damit verbunden auch keine thermodynamische Assoziation der eingesetzten Proteine (Abbildung 3.36 D und E). Die ITC-Messungen spiegeln somit die mittels Gelfiltration (Tabelle 3.4) erhaltenen Ergebnisse der Komplexbildung in Gegenwart von 100 μM ZnCl₂ wieder.

Weiterhin konnten für die Interaktion zwischen r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C auch ohne zusätzliche Zugabe von Zn²⁺-Ionen in den ITC-Puffer eine Wärmeänderung während der Titration beobachtet und somit eine Assoziation detektiert werden (Abbildung 3.36 C). Die entsprechenden Titrationskurven wurden nach einen fest implementierten 1:1 Bindungsmodell ausgewertet und die thermodynamischen Parameter K_A , ΔG^o , ΔH_B und ΔS_B sowie der K_D -Wert, welcher durch die Beziehung

$$K_D = \frac{1}{K_A}$$
 (Gleichung 3.1)

berechnet wurde, sind in der Tabelle 3.5 aufgelistet. Die Bindung zwischen r-Trypsiligase und der entsprechenden Eglin C-Variante verlief stets exotherm. Die aus den Messungen ermittelten apparenten Stöchiometrien entsprechen einem Bindungsverhältnis von 0,7:1 bis 1:1. Für die Bildung des Komplexes zwischen Trypsin und den Eglin C-Varianten wird ein Verhältnis von 1:1 erwartet.

Tabelle 3.5: Thermodynamische Parameter für die Interaktion von r-Trypsiligase und den entsprechenden Eglin C-Varianten. Die thermodynamischen Parameter wurden wie unter 2.7.2 beschrieben bei 25 °C mittels ITC ermittelt.

Eglin C-Variante	K_{A}	K_{D}	$\Delta G^{ m o}$	$\Delta H_{ m B}$	-T ΔS_{B}
	(μM^{-1})	(μΜ)	(kJ mol ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)	(kJ mol ⁻¹)
L45K-Eglin C in Gegenwart	0.74 ± 0.09	1.36 ± 0.16	-33,52 ± 1,1	$-26,98 \pm 0,85$	-6,54 ± 1,1
von 100 μM ZnCl ₂	0,74 ± 0,09	1,30 ± 0,10	-55,52 ± 1,1	-20,96 ± 0,63	-0,34 ± 1,1
L45Y/L47H-Eglin C in	9 56 + 1 76	0.117 + 0.02	-39.38 ± 0.61	$-18,16 \pm 0,28$	21 22 + 0.61
Gegenwart von 100 μM ZnCl ₂	$8,56 \pm 1,76$	$0,117 \pm 0,02$	-39,38 ± 0,61	$-18,10 \pm 0,28$	$-21,22 \pm 0,61$
L45Y/L47H-Eglin C in	$13,4 \pm 3,3$	0.075 ± 0.018	-40.72 ± 0.65	-17.0 ± 0.27	$-23,73 \pm 0,65$
Abwesenheit von ZnCl ₂	13,4 ± 3,3	0,073 ± 0,018	-40,72 ± 0,03	-1 /,0 ± 0,2 /	-23,73 ± 0,03

Dabei zeigt sich, dass die Affinität (K_D) von L45Y/L47H-Eglin C mit 117 nM im Vergleich zu L45K-Eglin C (1,36 μ M) zu r-Trypsiligase zehnfach höher ist. Dies war auch zu erwarten,

da Trypsiligase gegenüber Substraten mit einem Tyrosinrest in P1-Position die höchste katalytische Aktivität aufweist (Liebscher, 2007). Da die Position 45 im Inhibitor Eglin C dem P1-Rest des Substrats entspricht, sollte die Inhibierung beim Vorhandensein eines Tyrosinrests (L45Y/L47H-Eglin C) im Vergleich zu einem Lysinrest (L45K-Eglin C) an dieser Position stärker sein, wobei ein Einfluss des Histidinrests an der Position 47 in L45Y/L47H-Eglin C nicht ausgeschlossen werden kann. Unter Berücksichtigung der experimentellen Fehler sind die Affinitäten von L45Y/L47H-Eglin C und r-Trypsiligase in Gegenwart von 100 μM ZnCl₂ und in Abwesenheit von ZnCl₂ fast identisch, was bedeutet, dass Zn²⁺-Ionen nur einen geringen bzw. keinen Effekt auf die Bindung zwischen r-Trypsiligase und dem Inhibitor haben. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch ohne Zugabe von ZnCl₂ bereits Zn²⁺-Ionen aufgrund von Pufferverunreinigungen an der Metallbindestelle von r-Trypsiligase komplexiert waren, wodurch die zusätzliche Zugabe von ZnCl₂ keinen Einfluss mehr auf die Assoziation hätte.

Die freie Energie der Bindung von r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C ist mit ca. -40,0 kJ mol⁻¹ um ca. -6,5 kJ mol⁻¹ größer als für den Komplex von r-Trypsiligase und L45K-Eglin C.

3.2.2.5 Analyse des Oligomerisierungszustandes von r-Trypsiligase mittels analytischer Ultrazentrifugation

Um den Oligomerisierungszustand von r-Trypsiligase zu analysieren, wurde wie unter 2.7.3 beschrieben durch Sedimentationsgleichgewichtsläufe an einer analytischen Ultrazentrifuge die mittlere, "apparente" molare Massen, die von der theoretischen molaren Masse abweichen kann, wenn eine Mischung von verschiedenen Oligomer-Zuständen in der Lösung vorliegt, der entsprechenden Proben bestimmt. Dabei zeigt die Analyse (Tabelle 3.6), dass sich die apparente molare Masse von r-Trypsiligase in Abwesenheit von Zn²+-Ionen nur um +0,4 kDa von der theoretischen molaren Masse unterscheidet. In Anwesenheit von Zn²+-Ionen wächst die Differenz zwischen der ermittelten apparenten molaren Masse und der theoretischen auf +4,9 kDa an. Diese Zunahme der apparenten molaren Masse in Gegenwart von Zn²+-Ionen könnte auf eine Zink-induzierte Oligomerisierung hinweisen, da die monomere molare Masse von r-Trypsiligase unabhängig von der An- oder Abwesenheit der Zn²+-Ionen gleichbleibend ist.

Bei der Analyse des Komplexes von r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C ist zu erkennen, dass die apparente molare Masse um 4,3 kDa kleiner ist als die theoretische molare Masse des

Komplexes. Ein Grund dafür könnte freies, ungebundenes Eglin C sein, welches mit ca. 8 kDa die mittlere molare Masse verringern würde. Andererseits könnte freie r-Trypsiligase, welche nicht mit Eglin C komplexiert ist, vorliegen. Diese besitzt mit einer theoretischen molaren Masse von 23,8 kDa ebenso eine kleinere molare Masse im Vergleich zum Komplex und würde so die apparente molare Masse der Lösung reduzieren.

Tabelle 3.6: Apparente molare Masse der entsprechenden Proteinlösungen, ermittelt durch Sedimentationsgleichgewichtsläufe mittels analytischer Ultrazentrifugation nach 2.7.3.

Proteinkomponente	apparente molare Masse	theoretische molare Masse
r-Trypsiligase ohne ZnCl ₂	24,2 kDa	23,8 kDa
r-Trypsiligase mit 100 μM ZnCl ₂	28,7 kDa	23,8 kDa
r-Trypsiligase L45Y/L47H-Eglin C-Komplex mit 100 μM ZnCl ₂	27,8 kDa	32,1 kDa

Um eine mögliche Oligomerisierung von r-Trypsiligase in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen näher zu charakterisieren und eine mögliche Dissoziationskonstante zu bestimmen, wurden im entsprechenden Puffersystem Sedimentationsgeschwindigkeitsläufe in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration durchgeführt. Dabei war mit zunehmender Konzentration von r-Trypsiligase ein Anstieg des apparenten Sedimentationskoeffizienten (s_{app}) zu beobachten. Durch die Auftragung der Sedimentationskoeffizienten gegen die Konzentration von r-Trypsiligase (Abbildung 3.37) und die entsprechende hyperbole Anpassung konnte ein Dissoziationskonstante (K_D) von 70 ±20 μ M (1,64 ± 0,47 mg ml⁻¹) ermittelt werden.

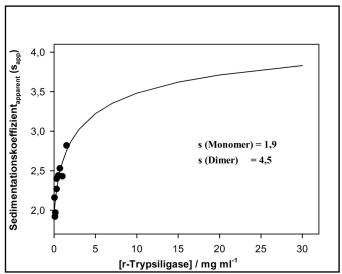


Abbildung 3.37: Auftragung der Sedimentationskoeffizienten (s_{app}) gegen die Konzentration von r-Trypsiligase und die hyperbole Anpassung zur Bestimmung von K_D . Der berechnete Sedimentationskoeffizient für reines Monomer liegt bei 1,9 und für reines Dimer bei 4,5. Für K_D wurde ein Wert von $70 \pm 20 \,\mu\text{M}$ ($1,64 \pm 0,47 \,\text{mg ml}^{-1}$) bestimmt.

Es ist jedoch zu beachten, dass für s_{app} noch keine Sättigung erreicht wurde, wodurch die hyperbole Anpassung und damit verbunden der ermittelte K_D -Wert mit einem sehr großen Fehler behaftet ist. Jedoch deutet der Anstieg von s_{app} mit den Proteinkonzentrationen als auch die Zunahme der apparenten molaren Masse in Gegenwart von Zn^{2+} -Ionen (Tabelle 3.6) auf einen Oligomerisierungsprozess hin. Die Bestimmungen der Sedimentationskoeffizienten bei höheren Proteinkonzentrationen wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da eine Auswertung solcher Daten aufgrund der ausgeprägten nicht-Idealität der Lösung nur möglich wäre, wenn der zweite Virialkoeffizient der Proteinlösung bekannt wäre.

Die Untersuchungen mittels analytischer Ultrazentrifugation geben Hinweise darauf, dass r-Trypsiligase in Lösung möglicherweise als eine Monomer-Dimer-Gemisch vorliegt, das durch Zn^{2+} -Ionen hervorgerufen oder verstärkt wird. Die Bestimmung des K_D -Wertes mit einem Schätzwert von 70 μ M verdeutlicht, dass die Affinität in einem Konzentrationsbereich liegt, der bei Messungen wie z. B. für die Aktivität nicht relevant ist.

3.2.3 Struktur von b-Trypsiligase und YRH-Ecotin Kristallform V

Durch die Kristallisation von Trypsiligase mit einem makromolekularen Inhibitor und die anschließende Analyse der Interaktionen der Bindepartner auf molekularer Ebene sollte auf eine analoge Interaktion zu Substraten geschlossen werden können. Dies ist vor allem dann der Fall, wenn die Sequenz des *reactive site loop* (siehe 1.3), dessen Aminosäurereste mit den Substratbindetaschen der Protease wechselwirken, der Sequenz der Substrate, welche in den Aktivitätsmessungen verwendet werden, ähnelt bzw. identisch ist. So sollten die Aussagen über intermolekulare Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor (Pseudo-Substrat) und Trypsiligase Schlussfolgerungen zulassen, die bei der Optimierung bzw. Manipulation von Substrate *engineering*) oder Enzymen (*protein engineering*) für die enzymvermittelte Peptid-Ligation genutzt werden könnten.

Die Versuche der Kokristallisation zwischen r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C, welche die höchste gemessene Affinität zueinander aufwiesen (3.2.2.4), führte zwar zu Kristallen, diese konnten aber bisher nicht soweit optimiert werden, dass eine Röntgenkristallstrukturanalyse und eine Strukturaufklärung möglich war (Daten nicht gezeigt). Aus diesen Grund sollte der Serinproteaseinhibitor Ecotin, welcher ursprünglich im Periplasma von E. coli gefunden wurde (Chung et al., 1983), zur Kokristallisation mit b-Trypsiligase verwendet werden. Dadurch, dass die P1-, P1'- und P2'-Reste von Ecotin, welche der YRH-Sequenz des Substrats entsprechen, in Nachbarschaft zu der den Inhibitor stabilisierenden Disulfidbrücke liegen (McGrath *et al.*, 1991), ist die vollständige Substitution der YRH-Sequenz in Ecotin möglich. Des Weiteren sind bereits Röntgenkristallstrukturanalysen für Komplexe aus Trypsin und Ecotin bekannt, welche die Suche nach geeigneten Bedingungen für die Kristallisation vereinfachen könnten (McGrath *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998; Brinen *et al.*, 1996). Die Ecotin-Variante M84Y/M85R/A86H (YRH-Ecotin) wurde wie unter 2.4.4 beschrieben generiert und gereinigt.

Die Kristallisation des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin wurde wie unter 2.8.1 beschrieben, durchgeführt. Vorversuche mit Zn²⁺-Ionen mit Konzentrationen von 500 μM führten zu Aggregationen in den Kristallansätzen, so dass im Folgenden vom Zusatz der Zn²⁺-Ionen mit Konzentration höher 100 μM im Kristallisationspuffer abgesehen wurde. Der Komplex aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin zeigte wie in der Literatur für Rattentrypsin und Ecotin bereits beschrieben in 0,15 M Na-Cacodylat, 0,3 M Na-Acetat, 15,5% (w/v) PEG 4000, pH 6,5 (McGrath *et al.*, 1994) bzw. 0,3 M Na-Acetat, 0,1 M Tris, 10 mM CaCl₂, 20% (w/v) PEG 4000, pH 8,0 (Brinen *et al.*, 1996) Kristalle, wobei diese jedoch amorph wuchsen (Abbildung 3.38 A und B). Dieses Wachstum verschiedenartiger nadelförmiger Kristalle aus einem Kristallisationskeim und die damit verbundene unterschiedliche Orientierung der Kristallgitter und die somit überlappenden Beugungsmuster erschwerten die Aufnahme von Datensätzen und somit die Kristallstrukturanalyse.

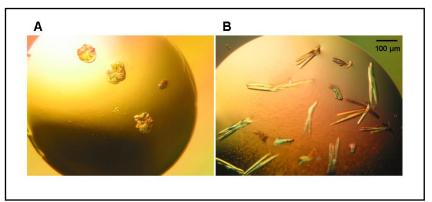


Abbildung 3.38: Kristalle des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin. Kristalle, gewachsen in A: 0,15 M Na-Cacodylat, 0,3 M Na-Acetat, 15,5% (w/v) PEG 4000, pH 6,5 und B: 0,3 M Na-Acetat, 0,1 M Tris, 10 mM CaCl₂, 20% (w/v) PEG 4000, pH 8,0 (Kristallform V, P2₁).

Einzig aus der Kristallisationsbedingung nach Brinen *et al.* (Abbildung 3.38 B) konnte ohne weitere Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen ein einzelner Kristall isoliert werden und ein Datensatz aufgenommen werden. Die Parameter der Datensammlung und der Verfeinerung dieses Kristalls sind im Anhang A.11 aufgelistet. Das Phasenproblem konnte wie unter 2.8.3 beschrieben mit Hilfe des MR unter einsetzen von Trypsin (PDB-Code 1MTS, Stubbs *et al.*, 1995) und dem Ecotin-Dimer (PDB-Code 1SLU, Brinen *et al.*, 1996) gelöst

werden. Dabei befinden sich in der monoklinen Raumgruppe P2₁ (Kristallform V, $a = 94,24; b = 78,62; c = 98,08; \alpha = 90^\circ; \beta = 96,62^\circ; \gamma = 90^\circ$), in welcher der Kristall des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin gewachsen ist, jeweils vier Moleküle des Komplexes in der asymmetrischen Einheit.

Hierbei befinden sich jeweils zwei YRH-Ecotin-Moleküle in dimerisierter Form (Abbildung 3.39). Dies ist sowohl für Ecotin in Lösung (Yang et al., 1998) wie auch in kristallisierter Form (McGrath et al., 1994; Brinen et al., 1996) bekannt. Die reactive site loops (siehe 1.3) der einzelnen YRH-Ecotin-Monomere (Aminosäurereste 81 - 86) befinden sich auf den gegenüber liegenden Seiten des Ecotin-Dimers, welches durch nicht kovalente Wechselwirkungen der jeweiligen C-Termini gebildet wird (Yang et al., 1998). Die beiden Trypsin-Moleküle, die von einem YRH-Ecotin-Dimer gebunden werden, befinden sich durch ihre Interaktion mit den entsprechenden reactive site loop ebenso an den gegenüberliegenden Seiten des Ecotin-Dimers (Abbildung 3.39).

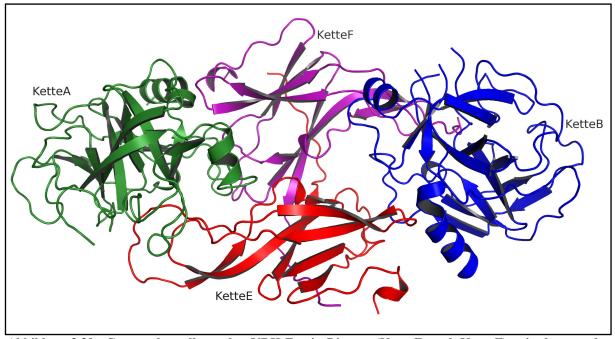


Abbildung 3.39: Cartoondarstellung des YRH-Ecotin-Dimers (Kette E und Kette F) mit den an den gegenüberliegenden Seiten gebundenen b-Trypsiligase-Molekülen (Kette A und Kette B). Die zwei Monomere von YRH-Ecotin, die zu einem Dimer assoziieren, sind rot und lila dargestellt. Die entsprechenden Moleküle von b-Trypsiligase, die durch Ecotin gebunden werden, sind grün und blau gezeigt. Diese Abbildung repräsentiert eine halbe asymmetrische Einheit der Kristallform V.

Die vier sich in der asymmetrischen Einheit befindenden Moleküle von b-Trypsiligase besitzen die Kettenbezeichnungen A, B, C und D, wohingegen die Moleküle von YRH-Ecotin E, F, G und H als Kettenbezeichnungen tragen. Der Vergleich zwischen den einzelnen Molekülen von b-Trypsiligase zeigt, dass sich die Positionen der Cα-Atome nicht sonderlich unterscheiden. So weisen die Cα-Atome der Kette A einen RMSD-Wert von 0,232 Å zu

denen in Kette B (0,171 Å zu Kette C und 0,241 Å zu Kette D) auf. Die vier Komplexe von b-Trypsiligase und YRH-Ecotin aus der asymmetrischen Einheit zeigen unterschiedliche Elektronendichten für die Aminosäurereste der Aktivierungsdomäne, welche ebenso Teil der Substratbindetaschen (siehe 1.4.2) darstellen. So konnten für keines der vier Moleküle von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin die gesamten Koordinaten der Aminosäurereste aus dem *autolysis loop* identifiziert werden. Des Weiteren sind die Elektronendichten für die Aminosäurereste der *surface loops* I und II in den vier Molekülen von b-Trypsiligase unterschiedlich vorhanden, so dass z. B. in den Ketten A und C der *surface loop* I vollständig in die Elektronendichte gebaut werden konnte, wohingegen die Elektronendichte für diese Region in den Ketten B und D nur teilweise bzw. gar nicht vorhanden ist.

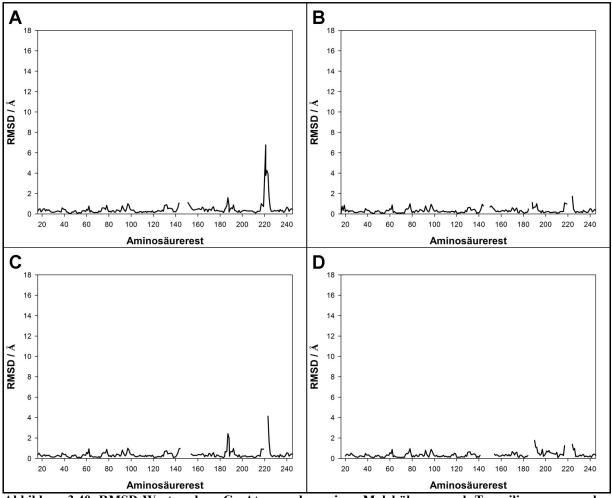


Abbildung 3.40: RMSD-Werte der Cα-Atome der vier Moleküle von b-Trypsiligase aus der Kristallform V mit Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ). Es sind die RMSD-Werte der Cα-Atome der entsprechenden Aminosäurereste der A: Kette A, B: Kette B, C: Kette C und D: Kette D von b-Trypsiligase und Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ) gezeigt. Aufgrund der teilweise fehlenden Elektronendichten in der Aktivierungsdomäne der Moleküle von b-Trypsiligase konnten dort keine RMSD-Werte ermittelt werden, so dass sich in diesen Bereichen Unterbrechungen in den Graphen befinden.

Der Vergleich der Positionen der Cα-Atome zwischen b-Trypsiligase aus dem Komplex mit YRH-Ecotin und der Struktur von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ) weist einen

RMSD-Wert von 0,798 Å auf. Dabei zeigt sich, dass die größten Unterschiede mit etwa 7 Å im *surface loop* II zu finden sind (Abbildung 3.40 A). Diese Reste (217 - 224) verbinden die Aminosäurereste des *surface loops* II, die als Teil der S1-Bindetasche bekannt sind (siehe 1.5.1), miteinander. Aufgrund der unterschiedlichen Elektronendichten in den vier Molekülen von b-Trypsiligase in der asymmetrischen Einheit der Kristallform V und den daraus resultierenden Unterschieden in der Anzahl der aufgelösten Aminosäurereste kann kein vollständiger Vergleich der Ketten A - D mit Wildtyp-Trypsin erfolgen. Da wie oben beschrieben sich die vier Ketten von b-Trypsiligase in der Kristallform V im Komplex durch den RMSD-Wert nur minimal unterscheiden und in der Kette A die meisten Positionen der Aminosäurereste anhand ihrer Elektronendichte identifiziert werden konnten, wird im Folgendem nur noch die Kette A für Vergleiche verwendet.

Dabei zeigt sich beim Vergleich der Position des *surface loop* II in b-Trypsiligase mit der des Wildtyp-Trypsins, dass aufgrund der Substitution des Lysins an der Position 189 die Ausrichtung wie in der Wildtyp-Struktur nicht mehr möglich ist (Abbildung 3.41). Die Lys189-Seitenkette der Trypsiligase würde mit der Konformation des *surface loop* II im Wildtyp-Trypsin kollidieren (Abbildung 3.41 C), wohingegen bei der im Komplex mit YRH-Ecotin eingenommenen Ausrichtung des *surface loop* II keine sterische Behinderung mit dem substituierten Aminosäurerest stattfindet (Abbildung 3.41 B).

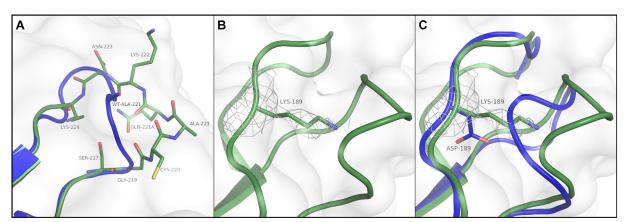


Abbildung 3.41: Orientierung des *surface loop* II in der Kristallform V von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin im Vergleich zur Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ). A: Stabdarstellung der Aminosäurereste Ser217 - Lys224 (C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot, S-Atome gelb) des *surface loop* II im Komplex aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin (Cartoondarstellung grün) im Vergleich mit dem *surface loop* II in Wildtyp-Trypsin (Cartoondarstellung in blau). Als Orientierung wurde die Seitenkette des Ala221 in Wildtyp-Trypsin in blauer Stabdarstellung gezeigt. B: Stabdarstellung der Seitenkette von Lys189 (C-Atome grün, N-Atome blau) mit seiner 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) aus dem Komplex von b-Trypsiligase und YRH-Ecotin und die *surface loops* I und II (Cartoondarstellung grün). C: Stabdarstellung der Lys189-Seitenkette (C-Atome grün, N-Atome blau) und seine 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) aus dem Komplex von b-Trypsiligase und YRH-Ecotin (Cartoondarstellung grün) und dem *surface loop* II aus Wildtyp-Trypsin (Cartoondarstellung in blau) mit der Asp189-Seitenkette (C-Atome blau, O-Atome rot). Die Oberfläche von b-Trypsiligase ist weiß dargestellt.

Die Substitution des Lysins an der Position 189 im *surface loop* I ist somit offenbar ausschlaggebend für die Neuorientierung des benachbarten *surface loop* II im inhibitor- und somit auch im substratgebundenen Zustand. Dies wird durch den Befund unterstützt, dass der *surface loop* II seine Position zwischen dem inhibitorfreien und -gebundenen Zustand von Trypsiligase wenig ändert. So zeigt der Vergleich der Cα-Atome des *surface loops* II zwischen den Strukturen von r-Trypsiligase (3.2.1.3) und b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin maximale RMSD-Werte < 2,0 Å (Abbildung 3.42 B).

Der RMSD-Wert aller C α -Atome zwischen der Struktur von b-Trypsiligase aus dem Komplex mit YRH-Ecotin und der Kette A von r-Trypsiligase (3.2.1.3) beträgt 0,968 Å und ist somit um 0,17 Å höher als im Vergleich zum Wildtyp-Trypsin. Dieser größere RMSD-Wert kommt jedoch durch die unterschiedliche Konformation des *loop* 37 - 40 in der Kristallform IV von r-Trypsiligase (Abbildung 3.42 B) im Vergleich zur b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin zustande. Im Gegensatz zu den RMSD-Werten der C α -Atome aus der Aktivierungsdomäne beim Vergleich von b-Trypsiligase aus dem Komplex mit YRH-Ecotin und der Kristallform IV von r-Trypsiligase (3.2.1.3) (\leq 2 Å, Abbildung 3.42 B) sind die RMSD-Werte der C α -Atome der Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase aus dem Komplex mit YRH-Ecotin und der Kristallform III von b-Trypsiligase (3.2.1.2) mit ca. 7 Å deutlich größer (Abbildung 3.40 A).

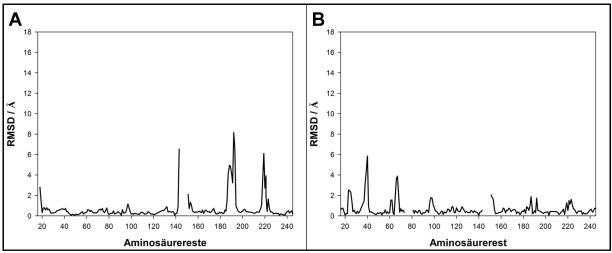


Abbildung 3.42: RMSD-Werte der Cα-Atome der Kette A von b-Trypsiligase aus der Kristallform V mit A: der Kristallform III von b-Trypsiligase (3.2.1.2) bzw. B: der Kristallform IV von r-Trypsiligase (3.2.1.3). Für die Aminosäurereste Thr144 - Ser150 konnten keine Elektronendichten identifiziert werden, so dass keine RMSD-Werte für diese ermittelt werden konnten und sich in diesem Bereich Unterbrechungen in den Graphen befinden.

Da sich b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin ähnlich wie r-Trypsiligase in der Kristallform IV verhält, sind im Vergleich mit der zymogenähnlichen Kristallform III von b-Trypsiligase ähnlich hohe RMSD-Werte wie für den Vergleich zwischen den Strukturen der

Kristallform III und Kristallform IV zu erwarten (siehe Abbildung 3.25 B). Da die Elektronendichte im *autolysis loop* der Kristallform V nicht vollständig vorhanden war und somit keine RMSD-Werte berechnet werden konnten (Abbildung 3.42 A), ist die andersartige Konformation und damit die Größe der RMSD-Werte zu der b-Trypsiligase der Kristallform III nur spekulativ.

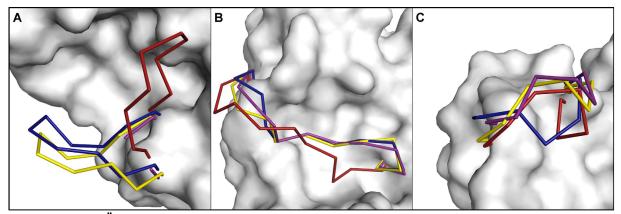


Abbildung 3.43: Überlagerung der Aktivierungsdomäne von b-Trypsiligase der Kristallform V im Komplex mit YRH-Ecotin mit der r-Trypsiligase der Kristallform IV (3.2.1.3) mit der b-Trypsiligase der Kristallform III (3.2.1.2) und Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ). Dargestellt ist die fiktive Oberfläche (weiß) aller Aminosäurereste von Trypsiligase, die nicht zum *autolysis loop* oder den *surface loops* I und II gehören. In Bänderdarstellung ist in A: der *autolysis loop*, B: der *surface loop* I, C: der *surface loop* II von b-Trypsiligase aus dem Komplex mit YRH-Ecotin der Kristallform V (lila), r-Trypsiligase der Kristallform IV (gelb), b-Trypsiligase der Kristallform III (rot) und von Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, blau) gezeigt. Zur Orientierung der Lage zwischen den drei *loops* siehe auch Abbildung 1.8.

Es wird ersichtlich, dass sowohl die Aminosäurereste des *autolysis loops* (Abbildung 3.43 A), die anhand ihrer Elektronendichte identifiziert werden konnten, wie auch der *surface loop* I (Abbildung 3.43 B) im b-Trypsiligase aus dem Komplex mit YRH-Ecotin (Kristallform V), im Verlauf des Polypeptidrückgrates in den meisten Positionen denen des Wildtyp-Trypsins entsprechen. Dagegen zeigt der *surface loop* II von b-Trypsiligase aus dem Komplex mit YRH-Ecotin eine Konformation des Polypeptidrückgrates ähnlich der, die bereits für die Kristallform III b-Trypsiligase (3.2.1.2) und der Kristallform IV von r-Trypsiligase (3.2.1.3) gefunden wurde (Abbildung 3.43 C). Dies ist auf die bereits oben beschriebene Substitution des Lysins an der Position 189 zurückzuführen und somit verschieden von der Konformation, welche für den *surface loop* II in der Struktur des Wildtyp-Trypsins beobachtet wird.

Durch die Bindung des Inhibitors YRH-Ecotin an b-Trypsiligase zeigt Asp194, das als Indikator für die Aktivierung von Trypsinogen zum aktiven Trypsin dient, nun eine Konformation vergleichbar mit der im aktiven Trypsin (Abbildung 3.44). Dabei wird durch die konformationelle Änderung im Vergleich zur Kristallform III der b-Trypsiligase (3.2.1.2, Abbildung 3.17) die "begrabene Salzbrücke" zum Ile16, welches den N-Terminus des Enzyms darstellt, ausgebildet (Abbildung 3.44 A).

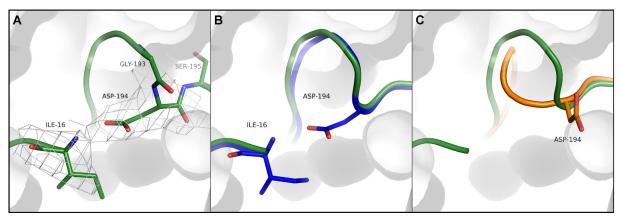


Abbildung 3.44: Konformation von Asp194 und Ile16 aus der Kristallform V von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin und Wildtyp-Trypsinogen. A: Asp194 und Ile16 (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) mit deren 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ , graues Gitter) aus b-Trypsiligase (Kette A, B und C, Cartoondarstellung grün) im Komplex mit YRH-Ecotin, B: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung grün) aus dem Komplex mit YRH-Ecotin mit Wildtyp-Trypsin (PDB-Code 3MFJ, Cartoondarstellung blau) und die Seitenketten von Asp194 und Ile16 (Stabdarstellung, C-Atome blau, N-Atome dunkelblau, O-Atome rot) von Wildtyp-Trypsin, C: Überlagerung von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung grün) aus dem Komplex mit YRH-Ecotin mit Wildtyp-Trypsinogen (PDB-Code 1TGB, Cartoondarstellung orange, Fehlhammer $et\ al.$, 1977) und die Seitenkette von Asp194 (Stabdarstellung, C-Atome orange, O-Atome rot) von Wildtyp-Trypsinogen.

Mit der Betrachtung des Asp194 (Abbildung 3.44) wird deutlich, dass durch die Bindung eines Inhibitors an Trypsiligase diese von einem zymogenähnlichen Zustand (3.2.1.2, Abbildung .3.17) in eine aktivähnliche Konformation überführt werden kann. Die Position des Asp194 ist in allen vier Molekülen von b-Trypsiligase der asymmetrischen Einheit der Kristallform V im Komplex mit YRH-Ecotin sehr ähnlich (Abbildung 3.44 A).

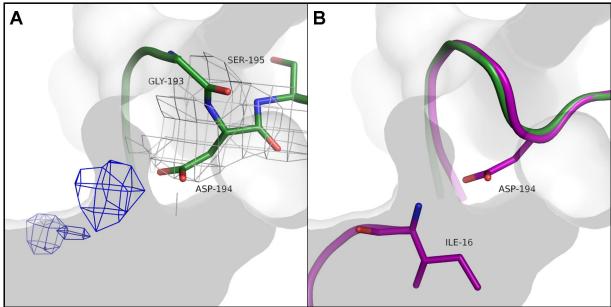


Abbildung 3.45: Elektronendichten der Aminosäurereste Ile16 & Asp194 der Kette D und der Kette A aus der Kristallform V von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin. A: Stabdarstellung des Asp194 (C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) der Kette D, seine 2Fo-Fc Elektronendichte (1 σ, graues Gitter) und die gesamte Fo-Fc Differenzelektronendichte (+3 σ, blaues Gitter) der Kette D (Cartoondarstellung grün) von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin, B: Überlagerung der Ketten A (Cartoondarstellung lila) und D (Cartoondarstellung grün) von b-Trypsiligase aus der Kristallform V im Komplex mit YRH-Ecotin und die Seitenketten von Asp194 und Ile16 (Stabdarstellung, C-Atome lila, N-Atome blau, O-Atome rot) der Kette A.

Dagegen zeigt Ile16 nur in den Ketten A, B und C der asymmetrischen Einheit der Kristallform V eine eindeutige Konformation. Ile16 der Kette D zeigt nur eine geringe bzw. keine Elektronendichte, was eine hohe Flexibilität anzeigt (Abbildung 3.45 A). Beim Vergleich der Kette D (Abbildung 3.45 A) mit der Kette A (Abbildung 3.45 B) von b-Trypsiligase ist an der Position der Aminogruppe des Ile16 eine positive Fo-Fc Differenzelektronendichte erkennbar. Aufgrund der jedoch fehlenden 2Fo-Fc Elektronendichte war kein Einbau des Ile16 sowie der sich anschließenden Aminosäurereste Val17, Gly18 und Gly19 im Molekül der Kette D von b-Trypsiligase möglich.

Die Strukturaufklärung des Komplexes aus b-Trypsiligase und dessen Inhibitor YRH-Ecotin ermöglicht nun eine Analyse der Interaktion der Aminosäurereste des Pseudo-Substrats mit den Aminosäureresten der Substratbindetaschen der Protease (Abbildung 3.46).

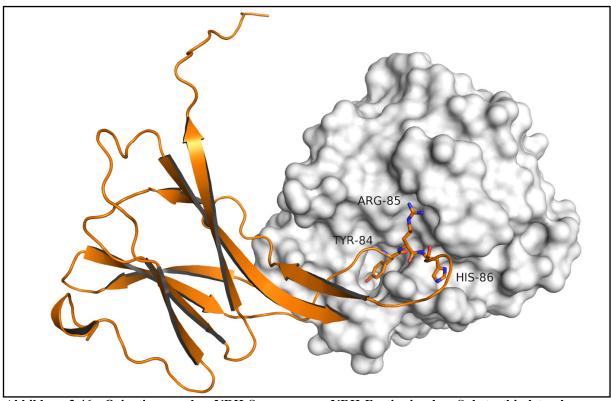


Abbildung 3.46: Orientierung der YRH-Sequenz aus YRH-Ecotin in den Substratbindetaschen von b-Trypsiligase. Gezeigt ist das Molekül der Kette E von YRH-Ecotin (Cartoondarstellung orange) mit seinem reactive site loop, wobei die Aminosäuresequenz Tyr84-Arg85-His86 (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau, O-Atome rot) mit den Substratbindetaschen von b-Trypsiligase (Oberflächendarstellung weiß) interagiert.

Tyr84 aus YRH-Ecotin (P1-Rest) ragt mit seiner Seitenkette vollständig in der S1-Bindetasche hinein (Abbildung 3.47 A). Die Hydroxylgruppe des Tyr84 bildet schwache Wasserstoffbrückenbindungen zum Amidstickstoff des Gly216 und des Ser217 sowie zwischen dem Oγ-Atom des Ser217 und dem Oη-Atom des Tyr84 in der S1-Bindetasche von b-Trysiligase (Abbildung 3.47 B). Weder die Aminosäurereste Gly219 und Gly226, wie dies

im strukturbasierten Modell angenommen wurde (Abbildung 1.12), noch Lys189 (Abbildung 3.47 B) der b-Trypsiligase spielen bei der Erkennung des Tyrosinrests in der S1-Bindetasche eine Rolle. Somit ist klar, dass die Substitution des Lysins in die S1-Bindetasche nicht über eine direkte Wechselwirkung für die Bevorzugung des Tyrosins in der Position des P1-Restes sorgt. Die Analyse der hydrophoben Wechselwirkungen, wie im Ligplot (Anhang A.12) dargestellt, zeigt, dass die Aminosäurereste Cys191, Val213, Trp215 und Gly216 mit dem Tyrosin aus der YRH-Sequenz des Inhibitors interagieren.

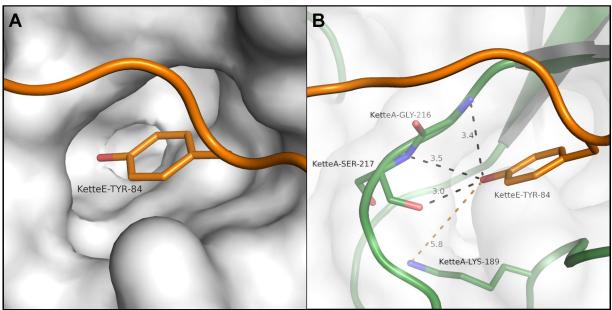


Abbildung 3.47: Konformation und Interaktionen des Tyr84 aus YRH-Ecotin. A: Orientierung der Seitenkette des Tyr84 (Stabdarstellung, C-Atome orange, O-Atome rot) aus YRH-Ecotin (Cartoondarstellung orange) in der S1-Bindetasche von b-Trypsiligase (Oberflächendarstellung weiß), B: Interaktionen der Hydroxylgruppe der Seitenkette des Tyr84 (Stabdarstellung, C-Atome orange, O-Atome rot) aus YRH-Ecotin (Cartoondarstellung in blau) mit den Aminosäureresten (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung grün), die einen Abstand (- - - -) \leq 3,5 Å aufweisen. Zum Vergleich ist die Seitenkette des in b-Trypsiligase substituierten Lys189 (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau, O-Atome rot) und der Abstand (- - - -) des Nζ-Atoms zum Oη-Atom des Tyr84 von YRH-Ecotin gezeigt.

Arg85, welches den P1'-Rest des Substrats darstellt, bildet wie erwartet eine Salzbrücke mit der substituierten Glutaminsäure an der Position 60. Der Abstand des Nη2-Atoms von Arg85 beträgt 3.2 Å bzw. 3.3 Å zum Oε1- bzw. Oε2-Atom des Glu60 (Abbildung 3.48 B), so dass in diesem Fall die negative Ladung der Carboxylgruppe des Glu60 in der S1'-Bindetasche mit der positiven Ladung der Guanidinogruppe des Arg85 als P1'-Rest wechselwirkt. Des Weiteren ist ersichtlich, dass das Nη1-Atom von Arg85 mit den Carbonylsauerstoffatomen von His57 und Tyr59 von b-Trypsiligase interagieren kann. Die Abstände betragen 3.5 Å zum O-Atom des His57 und 3.0 Å zu dem des Tyr59 (Abbildung 3.48 B). Phe41 und Cys42 interagieren über hydrophobe Wechselwirkungen mit dem Arg85 des Inhibitors (Ligplot, Anhang A.13).

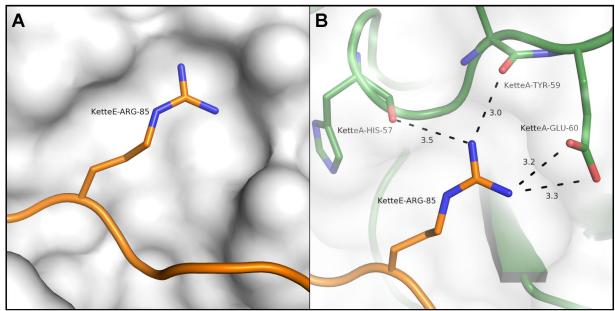


Abbildung 3.48: Konformation und Interaktionen des Arg85 aus YRH-Ecotin. A: Orientierung der Seitenkette des Arg85 (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau) aus YRH-Ecotin (Cartoondarstellung orange) in der S1'-Bindetasche von b-Trypsiligase (Oberflächendarstellung weiß), B: Interaktionen der Guanidinogruppe der Arg85-Seitenkette (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau) aus YRH-Ecotin (Cartoondarstellung orange) mit den Aminosäureresten (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung grün), die einen Abstand (- - - -) ≤ 3,5 Å aufweisen.

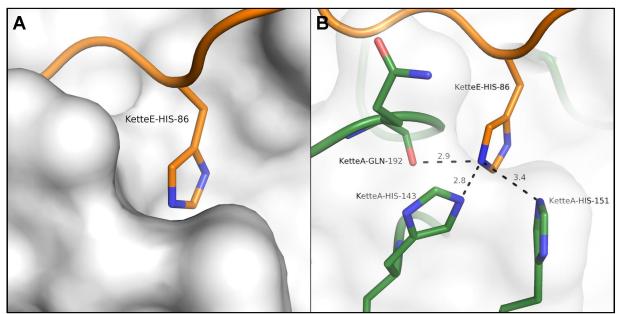


Abbildung 3.49: Konformation und Interaktionen des His86 aus YRH-Ecotin. A: Orientierung der Seitenkette des His86 (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau) aus YRH-Ecotin (Cartoondarstellung orange) in der S2'-Bindetasche von b-Trypsiligase (Oberflächendarstellung weiß), B: Interaktionen der Imidazolgruppe der His86-Seitenkette (Stabdarstellung, C-Atome orange, N-Atome blau) aus YRH-Ecotin (Cartoondarstellung orange) mit den Aminosäureresten (Stabdarstellung, C-Atome grün, N-Atome blau, O-Atome rot) von b-Trypsiligase (Cartoondarstellung grün), die einen Abstand (- - - -) ≤ 3,5 Å aufweisen.

Da im Kristallisationsansatz auf eine Zugabe von Konzentrationen der Zn^{2+} -Ionen >100 μ M verzichtet wurde, tritt der metallabhängige Zustand der Enzym-Substrat-Bindung in der Kristallform V von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin nicht vollständig ein. His86, welches den P2'-Rest in YRH-Ecotin darstellt, befindet sich in räumlicher Nähe zur

künstlichen Metallbindestelle der S2'-Bindetasche von Trypsiligase. Der Abstand des His86-Nɛ2-Atoms aus YRH-Ecotin zum His143-Nɛ2-Atom von b-Trypsiligase beträgt 2,8 Å und der zum His151-Nɛ2-Atom 3,4 Å (Abbildung 3.49 B). Weiterhin ist zu erkennen, dass das Gln192-Carbonylsauerstoffatom mit einen Abstand von 2,9 Å zum His86-Nɛ2-Atom mit diesem interagieren könnte. Des Weiteren können Tyr39, His40, Gly193 und Gln192 über hydrophobe Wechselwirkungen mit His86 interagieren (Ligplot, Anhang A.14).

Da der Komplex aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin in einem Puffer mit 100 μM ZnCl₂ (siehe 2.4.4) zur Kristallisation angesetzt wurde, bestand ebenso die Möglichkeit, dass Zn²⁺-Ionen an den entsprechenden Metallbindestellen komplexieren. Weil die Kristallisation des Komplexes jedoch mit einer Proteinkonzentration von 375 μM angesetzt wurde, war eine vollständige Sättigung der Metallbindestellen unwahrscheinlich. So konnte an der künstlichen Metallbindestelle der Kette B der b-Trypsiligase und dem entsprechenden Inhibitormolekül YRH-Ecotin (Kette F) eine Elektronendichte identifiziert werden (Abbildung 3.50 A), die in den anderen Komplexmolekülen der asymmetrischen Einheit nicht zu finden war. Diese Elektronendichte konnte als ein Zn²⁺-Ion modelliert werden, das entsprechend von den zwei Histidinresten 143 und 151 der artifiziellen Metallbindestelle von b-Trypsiligase und dem His86 des Inhibitors YRH-Ecotin komplexiert wird (Abbildung 3.50 A).

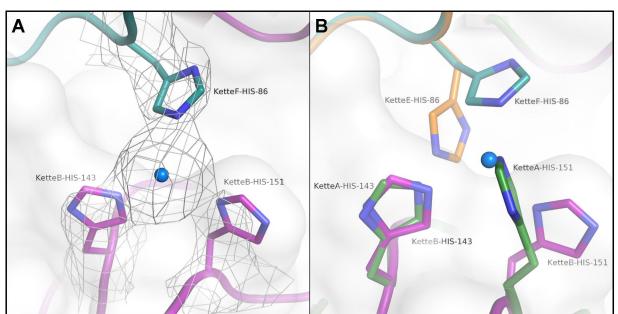


Abbildung 3.50: Metallbindestelle in der Kristallform V von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin. A: Orientierung des komplexierten Zn²+-Ions (blaue Kugel) und den Seitenketten des His86 (Stabdarstellung, C-Atome türkis, N-Atome blau) aus der Kette F (YRH-Ecotin, Cartoondarstellung türkis) bzw. des His143 und His151 (Stabdarstellung, C-Atome lila, N-Atome blau) aus der Kette B (b-Trypsiligase, Cartoondarstellung lila) mit deren 2Fo-Fc Elektronendichtekarten (1 σ, graues Gitter), B: Überlagerung der Zn²+-Ion unkomplexierten Kette A (b-Trypsiligase, Cartoondarstellung grün) und Kette E (YRH-Ecotin, Cartoondarstellung orange) (aus Abbildung 3.49 B), mit den in Abbildung 3.50 A beschriebenen komplexierten Ketten B und F der identischen Moleküle. Die Seitenketten der Aminosäurereste His86, His143 und His151 sind in Stabdarstellung (C-Atome Farbgebung der entsprechenden Cartoondarstellung, N-Atome blau) gezeigt. Die in A und B dargestellte Oberfläche entspricht der der Kette B der b-Trypsiligase.

Die Überlagerung des zinkgebundenen Komplexes mit dem zinkungebundenen Komplex (Abbildung 3.50 B) zeigt, dass sich vor allem beim His151 von b-Trypsiligase und dem His86 von YRH-Ecotin die Positionen der Seitenketten während der Zinkkomplexierung verändern. Hinsichtlich der Abstände zwischen den Histidinresten und dem komplexierten Zn²⁺-Ion wird deutlich, dass diese in der Struktur des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin größer sind als in der Kristallform III der b-Trypsiligase ohne Inhibitor (3.2.1.2). Dort liegen die Abstände des His143 und His151 von b-Trypsiligase bei 2,0 Å (Tabelle 3.1), wohingegen die identischen Aminosäurereste im Komplex Abstände von 2,4 Å bzw. 3,1 Å aufweisen (Abbildung 3.51 A). Auch im Vergleich zu der Komplexstruktur aus den Varianten N143H/E151H-Trypsin und A86H-Ecotin (Brinen *et al.*, 1996), in der die Abstände zum Zn²⁺-Ion zwischen 1,9 und 2,3 Å liegen (Abbildung 3.51 B), sind die hier ermittelten Abstände zwischen den Interaktionspartnern größer.

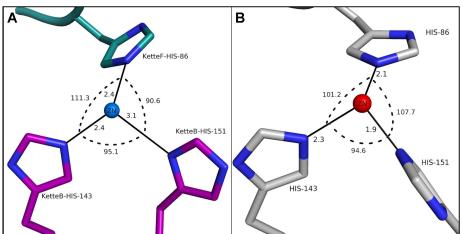


Abbildung 3.51: Abstände und Bindungswinkel zwischen dem Zn²⁺-Ion und dessen Interaktionspartnern in A: der Kristallform V von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin, B: N143H/E151H-Trypsin im Komplex mit A86H-Ecotin (PDB-Code 1SLX, Brinen *et al.*, 1996). A: Position des komplexierten Zn²⁺-Ions (blaue Kugel) und der Seitenketten des His86 (Stabdarstellung, C-Atome türkis, N-Atome blau) aus Kette F (YRH-Ecotin, Cartoondarstellung blau) bzw. des His143 und His151 (Stabdarstellung, C-Atome lila, N-Atome blau) aus Kette B (b-Trypsiligase, Cartoondarstellung lila). B: Position des komplexierten Zn²⁺-Ions (rote Kugel) und den Seitenketten des His86 (A86H-Ecotin), His143 und His151 (N143H/E151H-Trypsin) nach Brinen *et al.* (1996, C-Atome weiß, N-Atome blau). Die Abstände (in Å, mit —) und die Bindungswinkel (in °, mit - - - -) zwischen den Zn²⁺-Ionen und den Interaktionspartnern sind dargestellt.

Ein Grund für die unterschiedlichen Abstände könnte die schwache 2Fo-Fc Elektronendichte an der Metallbindestelle in der Kristallform V der b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin sein. So zeigt sich, dass die Elektronendichte z. B. um den Imidazolring des His151 in der Kette B von b-Trypsiligase nicht sehr stark ist, wodurch die exakte Positionierung der Seitenkette auch für die verwendeten Programme des *Refinements* schwierig wird.

Bei den ermittelten Bindungswinkeln (Abbildung 3.51, Anhang A.15) zeigt sich, dass der Winkel zwischen den zwei Histidinen vom r-Trypsiligase (His143 und His151), die das Zn²⁺-Ion einschließen, im Komplex mit 95,1° um ca. 21,5° kleiner ist als der identische Winkel in der inhibitorfreien Kristallform III von b-Trypsiligase (Tabelle 3.2). Im Vergleich zur bekannten Variante N143H/E151H-Trypsin im Komplex mit A86H-Ecotin (Brinen *et al.*, 1996), bei der der Winkel zwischen den zwei substituierten Histidinen (His143 und His151) und dem einschließenden Zn²⁺-Ion 93° aufweist, ist der Unterschied von 2° zum Komplex aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin in der Kristallform V deutlich geringer.

In den zinkgebundenen Molekülen von b-Trypsiligase (Kette B) und YRH-Ecotin (Kette F) der Kristallform V konnte neben den drei Histidinresten kein vierter Ligand für die Koordination des Zn²⁺-Ions in einer Tetraederform ermittelt werden wie dies für die Zinkkomplexierung in der Literatur vermutet wird. Ebenso wenig entsprechen die erhaltenen Bindungswinkel (Abbildung 3.51 A, Anhang A.15) den für ein Tetraeder idealen Winkeln von jeweils 109,5°.

4 Diskussion

4.1 EK-Trypsinogen und EK-Trypsin

Enzyme katalysieren praktisch alle metabolischen Reaktionen unter milden Bedingungen mit einer hohen Substratspezifität und Stereoselektivität bei einer um ein Vielfaches erhöhten Umsatzrate (Sterner, 2011). Diese Eigenschaften machen Enzyme für die Anwendung in biotechnologischen Prozessen interessant. Proteasen werden dabei, wie unter 1.6 bereits erläutert, unter anderem als Restriktionsproteasen genutzt. Die rekombinante Expression in prokaryotischen sowie in eukaryotischen Zellen und anschließende Reinigung findet eine weitverbreitete Anwendung, bei der die Proteine oft als Fusionspartner oder chimere Proteine produziert werden (Jenny et al., 2003), wobei im Anschluss an die Produktion und Reinigung die Spaltung der Fusionspartner oder auch von Affinitäts-tags meistens notwendig ist (Araujo et al., 2000). Um die Spaltung der durch Peptidbindungen verknüpften Fusionspartner durchzuführen, hat sich neben chemischen Methoden wie z. B der Cyanbromidspaltung (Döbeli et al., 1998; Karamloo et al., 2001; Fairlie et al., 2002) oder der Inteintechnologie (Cooper und Stevens, 1995; Volkmann und Mootz, 2012) auch die Proteolyse als leistungsfähiger Ansatz etabliert. Hierbei muss die Aminosäuresequenz, welche spezifisch von der entsprechenden Protease erkannt wird, zwischen dem Protein und dessen Fusionspartner insertiert werden. Als solche Restriktionsproteasen haben sich Serinproteasen wie z. B. Thrombin, Faktor Xa oder auch Enteropeptidase, welche die Peptidbindung nach den basischen Aminosäuren Lys oder Arg spalten, aber auch Serinproteasen wie z. B. die tobacco etch virus (TEV)-Protease, welche eine längere Peptidsequenzen erkennen, etabliert (Jenny et al., 2003).

Einzelne Beispiele für die Verwendung von Restriktionsproteasen verdeutlichen jedoch, dass trotz der spezifischen Erkennungssequenz, welche zwischen die Fusionspartner insertiert wurde, keine bzw. keine vollständige proteolytische Spaltung der Fusionsproteine durch die Protease statt findet. So konnte für das Fusionsprotein aus der langen Kette von Hydroxysäure-Oxidase und GST, in welche die für Faktor Xa spezifische Spaltsequenz IEGRGIP eingefügt wurde, nach Inkubation in Gegenwart von Faktor Xa mittels SDS-PAGE Analyse nur geringe Mengen an gespaltenem Fusionsprotein detektiert werden (Belmouden *et al.*, 1993). Analoge Analysen mit Trypsin zeigten hingegen, dass

dieses die Fusionspartner ohne weiteres an der insertierten Erkennungssequenz spaltet, jedoch auch weitere Peptidbindungen hydrolytisch spaltet, so dass drei Hauptbanden in der SDS-PAGE auftreten (Belmouden *et al.*, 1993). Aus diesen Studien schlussfolgerten Belmouden *et al.*, dass die Faktor Xa-Spaltsequenz zwischen den zwei Proteinen für Faktor Xa nicht zugänglich war. Die Vermutung der Unzugänglichkeit der eingeführten Spaltsequenz ist in der Literatur ebenso für andere Fusionspartner beschrieben (Ko *et al.*, 1993; Sharma und Rose, 1995; Wang *et al.*, 1999), bei denen die zugesetzte Protease nicht zur gewünschten Spaltung führte.

Diese Experimente zeigten, dass neben der spezifischen Erkennungssequenz auch die Zugänglichkeit eine Rolle für die erfolgreiche Spaltung von Fusionspartnern spielt. Hinsichtlich der verwendeten Protease spielt ihr dreidimensionaler Aufbau und damit verbunden die räumliche Zugänglichkeit der Substratbindetaschen und des aktiven Zentrums zur zu spaltenden Erkennungssequenz eine Rolle, wie dies z. B. für Faktor Xa und Trypsin am identischen Fusionsprotein durch Belmouden *et al.* (1993) gezeigt wurde.

Aus diesem Grund wurde die Variante S96K/N97R/T98R/L99K-Trypsin (EK-Trypsin), welche den 99er *loop* (Aminosäurereste 96 - 99) von Enteropeptidase enthielt, hergestellt (siehe 1.6.1). Dieses durch rationales, strukturbasiertes Enzymdesign generierte EK-Trypsin sollte hinsichtlich der Übertragbarkeit der Spezifität hin zu Enteropeptidasesubstraten analysiert werden. Dabei waren die Schwierigkeiten der Übertragung der Spezifität innerhalb von strukturell verwandten Mitgliedern bei den Trypsin-ähnlichen Serinproteasen bereits hinreichend bekannt (siehe 1.6.1). Die Analysen von EK-Trypsin sollten über die Zymogenaktivität von EK-Trypsinogen Aufschluss geben. Weiterhin sollten die Daten der Spezifität gegenüber dem natürlichen Substrat Trypsinogen mit denen für Enteropeptidase und Trypsin verglichen werden. Die Untersuchungen in Gegenwart von Substraten, die eine Enteropeptidase-Erkennungssequenz enthielten, sollten einen möglichen Einsatz von EK-Trypsin als Restriktionsprotease in der biotechnologischen Anwendung hinsichtlich der Spaltung von Fusionspartnern oder zur Aktivierung von zymogenen Proteasen aufzeigen.

Die schnelle Selbstaktivierung von EK-Trypsinogen zu EK-Trypsin (innerhalb von 10 min) verdeutlicht, dass mit der Einführung des 99er *loops* von Enteropeptidase in Trypsin eine Erhöhung der Spezifität gegenüber der im zymogenen EK-Trypsinogen vorliegenden Sequenz DDDDK erreicht wurde. Im Vergleich dazu sieht man in den Aktivierungsstudien von Trypsinogen (Abbildung 3.4), dass die Selbstaktivierung erst nach ca. 3 h einsetzt und erst nach mehreren Stunden beendet ist. Die hier durchgeführten Analysen zeigen im Gegensatz zu den bisher postulierten Zeiten von 3 h für die vollständige Selbstaktivierung von

EK-Trypsinogen zu EK-Trypsin (Tziridis, 2008), dass diese Selbstaktivierung deutlich schneller verläuft. Wie oben bereits erwähnt, läuft die Selbstaktivierung in EK-Trypsinogen um ein Vielfaches schneller als in Wildtyp-Trypsinogen ab. Der Grund dafür ist eine höhere katalytische Effizienz von Enteropeptidase im Vergleich zu Trypsin gegenüber der Erkennungssequenz DDDDK, was bereits für verschiedene Peptidsubstrate gezeigt werden konnte (Mikhailova et al., 2004) und somit möglicherweise auch von EK-Trypsin zutrifft. Es zeigte sich, dass die Selbstaktivierung zu EK-Trypsin, welche nach 10 min abgeschlossen ist, im Vergleich zu anderen Serinproteasen sehr schnell ist. So konnte für die Abspaltung des N-terminalen Propeptids einer modifizierten Variante von Granzym B, welche die für die Erkennung und Spaltung benötigte IEPD-Sequenz enthielt, gezeigt werden, dass die vollständige Selbstaktivierung erst nach mehreren Stunden abgeschlossen ist (Lorentsen et al., 2005). Die Frage, ob die Selbstaktivierung durch bereits während der Renaturierung und Reinigung vorhandene EK-Trypsin-Moleküle hervorgerufen oder durch das zymogene EK-Trypsinogen stattfindet, konnte durch eine zusätzliche Mutation in EK-Trypsin analysiert werden. Die Variante I16P-EK-Trypsin, welche nicht nach der Enteropeptidase-Erkennungssequenz DDDDK hydrolytisch gespalten werden kann, zeigt qualitative Aktivität gegenüber Trypsinsubstraten, was für die Aktivität des Zymogens spricht (Auerswald, 2011).

Hinsichtlich der Aktivität gegenüber Trypsinogen, dem natürlichen Substrat von Enteropeptidase, weist EK-Trypsin identische Parameter im Vergleich zu Enteropeptidase auf. Somit konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe des generierten EK-Trypsins eine N-terminal frei zugängliche Enteropeptidase-Erkennungssequenz, wie sie im flexiblen N-Terminus des Trypsinogens vorhanden ist, im gleichen Maße erkannt und gespalten werden kann, wie dies durch den natürlichen Aktivator geschieht. Dass die maximale spezifische Aktivität des gespaltenen Trypsinogens, welche sowohl bei Enteropeptidase als auch bei EK-Trypsin nach etwa 90 min erreicht wird, nicht die des aktiven Trypsins erreicht, kann nicht auf alleinige hydrolytische Spaltungen durch EK-Trypsin zurückgeführt werden. In diesem Fall würde sich der Kurvenverlauf zu dem mit Enteropeptidase versetzten Ansatz unterscheiden. Mit größerer Wahrscheinlichkeit kommt es zur Autolyse von dem durch die Aktivierung entstandenen Trypsin. So konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Aktivität von Trypsin durch Autolyse innerhalb von 12 h halbiert (Sriram et al., 1996). In den Aktivitätsstudien mit Trypsinogen als Substrat wirken also die Aktivierung durch die zugesetzte Protease und die Autolyse des entstandenen Trypsins einander entgegen. Eine Analyse der Aktivierung von S195A-Trypsinogen mit Hilfe der SDS-PAGE könnte eine

Aussage ermöglichen, ob EK-Trypsin weitere Peptidsequenzen im aktivierten Trypsin spaltet oder ob die Aktivierung von Trypsinogen durch EK-Trypsin spezifisch ist.

Die Untersuchungen mit DDDDK-RNase A zeigen ebenso, dass mit der Substitution des 99er loops von Enteropeptidase in Trypsin und dem so entstandenen EK-Trypsin die Substratspezifität hin zu einer künstlich eingefügten Enteropeptidase-Erkennungssequenz, die sich in einen oberflächenexponierten loop befindet, verschoben werden kann. So zeigt sich keine hydrolytische Spaltung des Substrats in Gegenwart von Wildtyp-Trypsin, wohingegen das Substrat von EK-Trypsin nach der Enteropeptidase-Erkennungssequenz gespalten wird. Jedoch ist durch den weiteren proteolytischen Abbau des entstandenen DDDDK-RNase S Produktes die Schwierigkeit des rationalen Enzymdesigns anhand der fehlenden Selektivität gegenüber den Peptidsequenzen des Substrates erkennbar. So ist zwar bekannt, dass Enteropeptidase im Allgemeinen Peptidsubstrate der Formel -(Asp/Glu)_n-Lys(Arg)-, wobei n = 1 - 4 sein kann, erkennen und hydrolysieren kann, jedoch liegt die katalytische Effizienz des Enzyms gegenüber der Sequenz DDDDK weit über der von anderen Peptiden mit dieser allgemeinen Formel (Mikhailova et al., 2004). In dem während der Hydrolyse entstehenden S-Protein, welches in der SDS-PAGE sichtbar ist, befindet sich nur eine Peptidbindung auf die diese allgemeine Formel für Enteropeptidasesubstrate zutrifft. So ist an der Position 18 im S-Protein ein Aspartatrest und an der Postion 19 ein Arginin zu finden, wodurch diese -DR-Sequenz prinzipiell von Enteropeptidase bzw. EK-Trypsin gespalten werden kann. Wie in den Ansätzen mit Enteropeptidase zu erkennen ist (Abbildung 3.5 A), ist das entstandene S-Protein der DDDDK-RNase S jedoch über den analysierten Zeitraum stabil. Dies deutet darauf hin, dass die Hydrolyse weiterer Enteropeptidase-Spaltstellen in DDDDK-RNase S nicht der Grund für den proteolytischen Abbau im Ansatz mit EK-Trypsin (Abbildung 3.5 C) ist. Vielmehr ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die nach der Entstehung von DDDDK-RNase S nun zugänglichen Trypsin-Spaltstellen (Allende und Richards, 1962), durch eine in EK-Trypsin noch bestehende Wildtyp-Trypsinaktivität proteoytisch gespalten werden und somit zum Abbau des Produktes während der Inkubation führt. Die Analysen mit DDDDK-RNase A zeigen, dass die Spezifität von Enteropeptidase hinsichtlich der Selektivität mit dem generierten EK-Trypsin für dieses Substrat nicht erreicht werden konnten.

Die Untersuchungen an DDDDK-RNase S bestätigen die Annahme einer Trypsinrestaktivität, da dieses Substrat sowohl durch Trypsin als auch durch EK-Trypsin proteolytisch abgebaut wird. So kann angenommen werden, dass durch die Substitution des 99er *loops* von Enteropeptidase in Trypsin die Primärspezifität von Trypsin nach basischen

Aminosäureresten (Lys/Arg) nicht vollständig unterdrückt wird. Diese Trypsinrestaktivität konnte ebenso für Pefachrome tPA, einem üblichen Trypsinsubstrat, bestätigt werden. So besitzt Trypsin eine katalytische Effizienz von 5,2 × 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ für Pefachrome tPA, wohingegen EK-Trypsin noch eine katalytische Effizienz von $7.7 \times 10^3 \,\mathrm{M}^{-1} \,\mathrm{s}^{-1}$ gegenüber diesem Substrat aufweist (Auerswald, 2011). Dabei ist die katalytische Effizienz von Enteropeptidase gegenüber diesem Substrat nicht bestimmt worden, so dass über die Höhe dieser Trypsinrestaktivität in EK-Trypsin keine Aussage getroffen werden kann. In den Analysen mit DDDDK-RNase S ist jedoch zu erkennen, dass die Spezifität von EK-Trypsin im Vergleich zu Trypsin verschoben ist. So zeigt Trypsin ein sichtbares Intermediat, was auf eine bevorzugte Spaltsequenz in DDDDK-RNase S hinweist, welches im Ansatz mit EK-Trypsin nicht erkennbar ist. Anhand von Pefachrome tPA konnte ebenso die verringerte Affinität von EK-Trypsin gegenüber diesem Substrat im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin bestätigt werden. Es konnte mit EK-Trypsin ein K_M-Wert von 3,5 mM für das Substrat bestimmt werden (Auerswald, 2011), wohingegen der Wert bei Messungen mit Wildtyp-Trypsin 23 µM beträgt (Rauh et al., 2002). Da jedoch wie oben beschrieben, keine analogen Messungen mit Pefachrome tPA und Enteropeptidase durchgeführt wurden, kann über die Affinität zu diesem Substrat keine quantitative Aussage getroffen werden.

Die S96K/N97R/T98R/L99K-Substitution des 99er loops von Enteropeptidase in Trypsin zur Generierung von EK-Trypsin zeigt die Möglichkeit der Übertragung der Spezifität durch den rationalen, strukturbasierenden Enzymdesignansatz. EK-Trypsin zeigt im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin eine klare Verschiebung der Spezifität hin zu Enteropeptidase-Spaltstellen. So konnte bereits gezeigt werden, dass mehrere Fusionsproteine, die über eine Enteropeptidase-Spaltstelle mit ihrem Zielprotein verknüpft waren, erfolgreich nach der Erkennungssequenz proteolytisch gespalten werden konnten (Tziridis, 2008). Ebenso konnte hier gezeigt werden, dass das natürliche Substrat der Enteropeptidase, das Trypsinogen, in der gleichen Art und Weise durch EK-Trypsin aktiviert wird, wie durch Enteropeptidase. Weiterhin findet die Spaltung einer an der Oberfläche exponierten Enteropeptidase-Erkennungssequenz in DDDDK-RNase A statt.

Hierbei zeigt sich jedoch die Problematik der Veränderung der Spezifität durch rationales, strukturbasiertes Enzymdesign. So besteht neben der Einführung der Spezifität aus dem strukturverwandten Enzym die Aufgabe darin, die Spezifität des Wildtyp-Enzyms durch die Mutationen auszuschalten oder so weit zu unterdrücken, dass diese unter den verwendeten Bedingungen keinen Einfluss auf die Reaktion besitzt. Im Falle von EK-Trypsin ist die Wildtypaktivität von Trypsin noch so hoch, dass proteolyseinstabile Substrate durch das

generierte Enzym hydrolytisch gespalten werden. Dies konnte sowohl durch die Analysen von DDDDK-RNase S wie auch durch den proteolytischen Abbau eines GST-Fusionsproteins [GST-DDDDK-PTH(1-34)] (Tziridis, 2008), welches zuvor mittels EK-Trypsin vom Zielprotein [PTH(1-34)] abgespalten werden konnte, gezeigt werden. Die Verringerung der katalytischen Effizienz im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin um das Tausendfache, welche durch die kinetischen Messungen von EK-Trypsin an Pefachrome tPA erhalten wurden (Auerswald, 2011), verdeutlicht, dass die restliche Wildtypaktivität weiterhin ausreicht um Trypsin-Spaltstellen zu erkennen und zu hydrolysieren.

Die Analysen von EK-Trypsinogen und EK-Trypsin verdeutlichen, dass nur mit dem Austausch des 99er *loops* zwischen Enteropeptidase und Trypsin keineswegs die gesamte Spezifität von einer verwandten Serinprotease auf die andere erreicht werden konnte. Die Schwierigkeiten bei den bereits bekannten Übertragungen der Primärspezifitäten von Trypsin auf Chymotrypsin (Hedstrom *et al.*, 1992; Hedstrom *et al.*, 1994), von Trypsin auf Elastase (Hung und Hedstrom, 1998) oder auch die Übertragung der Na⁺-Ionenabhängigkeit des Blutgerinnungsfaktors Xa auf Trypsin (Page *et al.*, 2006) stehen dabei in Einklang mit den hier erhaltenen und diskutierten Ergebnissen für EK-Trypsin.

In den strukturell konservierten Vertretern der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen werden dabei besonders den loop-Regionen, die die β-Stränge der entsprechenden β-Barrel-Strukturen miteinander verbinden, eine entscheidende Rolle in der Diskriminierung zwischen Substraten bzw. eine Kooperativität zugesprochen. So umgeben acht der elf oberflächenexponierten loop-Regionen das aktive Zentrum im Trypsinfaltungstyp, welche involviert sind in makromolekulare Wechselwirkungen wie auch in die allosterische Aktivierung durch mono- oder divalenten Kationen oder in die Aktivierung durch Protein-Kofaktoren Di Cera, 2006). (Page und Für die Übertragung Na⁺-Ionenabhängigkeit und damit verbunden der Übertragung der Spezifität von Faktor Xa auf Streptomyces griseus Trypsin (SGT) wurden in Experimenten zunächst drei der entsprechenden loop-Regionen (170er, 186er und 220er loop) übertragen, wobei das resultierende Enzym zwar die Na⁺-Ionenabhängigkeit aufwies, jedoch mit einer Aktivität von < 1% im Vergleich zum Wildtyp-Faktor Xa eine wenig aktive Protease darstellte (Page et al., 2006). Erst die zusätzliche Einführung des 99er loops von Faktor Xa in SGT (99er, 170er, 186er und 220er loop) zeigte eine Erhöhung der katalytischen Effizienz gegenüber Peptidsubstraten um das 50-fache und eine Erhöhung der Affinität zu Na⁺-Ionen um das Zweifache im Vergleich zu dem bereits vorhandenen mit den drei loop-Regionen (170er-, 186er-, 220er-loop) konstruierten SGT (Page et al., 2008). Eine weitere Substitution des

35er loops von Faktor Xa zu den vier bereits vorher substituierten loop-Regionen und dem damit generierten SGT (35er, 99er, 170er, 186er und 220er-loop) führte zu einer Aktivität, die hinsichtlich der Selektivität von Substraten vergleichbar zu der von Wildtyp-Faktor Xa ist (Page und Di Cera, 2010). Für dieses SGT-Enzym (35er, 99er, 170er, 186er und 220er loop von Faktor Xa) konnte mittels Peptidfragmenten, welche identisch zu den Sequenzen der natürlichen Substrate von Faktor Xa waren somit Rolle und eine der Blutgerinnungskaskade spielen, gezeigt werden, dass diese nur an den auch von Wildtyp-Faktor Xa hydrolysierten Peptidbindungen gespalten werden, was in diesen Experimenten nur 2 von 25 potentiellen Arginin- und Lysinpetidbindungen in den Oligopeptiden betraf (Page und Di Cera, 2010).

Diese aus der Literatur bekannten Beispiele lassen für EK-Trypsin schlussfolgern, dass der Vergleich dieser *loop*-Regionen und eine gezielte Übertragung von Aminosäurereste in diesen Bereichen von Enteropeptidase auf Trypsin ein geeigneter Ansatz sein könnte, um die Spezifität von EK-Trypsin weiter hin zu der von Enteropeptidase zu verschieben bzw. weg von der Spezifität von Trypsin.

Um die Spezifität von EK-Trypsin gegenüber der von Enteropeptidase bevorzugten Erkennungssequenz -DDDDK- (Maroux et al., 1971; Kim et al., 2008) weiter zu erhöhen, könnten weitere Mutationen in den Bindetaschen von EK-Trypsin vorgenommen werden. So ist in den Enteropeptidase-Varianten Tyr174Lys oder Tyr174Arg die Affinität zu der negativ geladenen Substratsequenz im Vergleich zur Wildtyp-Enteropeptidase erhöht (Chun et al., 2011). Dieses Beispiel verdeutlicht bereits den oben beschrieben Fakt der Wichtigkeit der Aminosäuresequenz in den *loop*-Regionen der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen. Wie aus den Untersuchungen von Chun et al. (2011) bekannt ist, scheint der Rest Tyr174 in Enteropeptidase in die Erkennung bzw. in die Bindung des Substrats involviert zu sein, jedoch liegt ein analoger Tyr174 Rest in Trypsin bzw. EK-Trypsin nicht vor (siehe Sequenzvergleich Anhang A1). Aus diesem Grund müsste im Falle der zu Enteropeptidase analogen Mutationen in EK-Trypsin zwischen Gly174 und Gln175 eine der beiden basischen Aminosäurreste insertiert werden. Ein struktureller Vergleich an dieser Position zeigt (Schöpfel et al., 2011), dass das Gln175 in Trypsin eine ähnliche Ausrichtung annimmt wie das Tyr174 in Enteropeptidase, so dass die zusätzliche Mutation Gln174Lys oder Gln175Arg in EK-Trypsin möglicherweise besitzen bei einen ähnlichen Effekt wie den analogen Enteropeptidase-Varianten (Chun et al., 2011).

Weiterhin ist vom Aminosäurerest an der Position 190, welcher Teil der S1-Bindetasche ist, in Enteropeptidase bekannt, dass diese eine Schlüsselrolle bei der Diskriminierung zwischen

den möglichen basischen Aminosäureresten in der P1-Position des Substrats spielt. Es ist bekannt, dass Trypsin-ähnliche Serinproteasen mit einen Alanin an der Position 190 eine 5,5-fach höhere Affinität zu einem P1-Argininrest im Vergleich zu einem P1-Lysinrest aufweisen (Bode *et al.*, 1997; Sichler *et al.*, 2002). Dagegen wird bei einem Serinrest an der Position 190 ein Lysin als P1-Rest bevorzugt (Sichler *et al.*, 2002). Diese Differenzierung erfolgt durch die unterschiedlichen Bindemodi der P1-Reste in der S1-Bindetasche (Evnin *et al.*, 1990). Da in EK-Trypsin an der Position 190 ein Serinrest lokalisiert ist, sollte in diesem Fall die Substratsequenz DDDDK gegenüber der möglichen Substratsequenz DDDDR bevorzugt werden. Jedoch könnte in Kombination mit gezielter Substratoptimierung, wie später diskutiert, eine spezifischere Spaltung von EK-Trypsin erreicht werden.

Des Weiteren könnten die Aminosäurereste an den Positionen 216 und 226, welche für die Größe und Form der S1-Bindetasche entscheidend sind, für die rationale, strukturbasierte Verbesserung der Spezifität von EK-Trypsin ausschlaggebend sein. Eine G216A-Mutation würde das für die Lysinbindung notwendige Wassermolekül verdrängen und damit das Wasserstoffbrückennetzwerk auflösen, so dass die Argininbindung in der S1-Bindetasche bevorzugt würde (Shaw, 1987). Auf der anderen Seite hätte eine G226A-Mutation den gegenläufigen Effekt. Der eingeführte Alaninrest an dieser Position würde zu einer sterischen Behinderung bei der Argininbindung führen, so dass die Lysinbindung in der S1-Bindetasche bevorzugt stattfinden würde (Shaw, 1987). Eine weitere Möglichkeit der Enzymoptimierung für spezifische Substrate zeigten Willett et al. (1995), indem sie durch die N143H/E151H-Substitution in Trypsin eine künstliche Metallbindestelle in S2'-Bindetasche von Rattentrypsin insertierten. Diese Variante zeigte in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen eine Spezifität gegenüber Peptidsubstraten, welche als P2'-Rest ein Histidinrest besitzen (Willett et al., 1995; Brinen et al., 1996). So könnte durch die Einführung von künstlichen Metallbindestellen in den entsprechenden S'-Bindetaschen von die Spezifität gegenüber Substraten mit natürlichen Histidinresten in den P1' - P5'-Positionen des Substrates erhöht werden und die Selektivität gegenüber potentiellen Trypsinspaltstellen weiter zu erhöhen.

Hinsichtlich der Substratoptimierung ist bekannt, dass neben den P-Resten auch die P'-Reste der Substrate unterschiedliche Affinitäten gegenüber den entsprechenden S'-Bindetaschen aufweisen. So zeigt sich z. B. in Chymotrypsin eine Präferenz von Lys/Arg als P1'-Rest, welche auf elektrostatische Wechselwirkungen zu Asp35 und Asp64 der S1'-Bindetasche zurückgeführt wird (Schellenberger *et al.*, 1994). Dabei ist jedoch zu beachten, dass die Spezifitäten in den S'-Bindetaschen zwischen verschiedenen Isoformen einer Serinproteasen

unterschiedlich sein können, wie dies bereits für Elastase gezeigt wurde (Renaud *et al.*, 1983). Die Untersuchungen der S1'-S3'-Spezifitäten in Rattentrypsin durch die Analyse des Acyltransfers von ganz unterschiedlichen Pentapeptiden zeigte, dass der Acyltransfer bei Anwesenheit eines Methioninrestes als P1'-Rest am schnellsten vonstatten geht, wodurch auf die höchste Spezifität der S1'-Bindetasche gegenüber diesem Aminosäurerest geschlossen wurde (Schellenberger *et al.*, 1994). Für die S2'- bzw. S3'-Bindetasche zeigen Lysin bzw. Tryptophan die höchsten Affinitäten (Schellenberger *et al.*, 1994). Aufgrund der oben beschriebenen Unterschiede zwischen Isoformen von Serinproteasen müsste die Präferenz gegenüber Methionin an der P1'-Position im bovinen, kationischen EK-Trypsin erst bestätigt werden. Anschließend könnte die entsprechende Erkennungssequenz im Substrat auf -DDDDK-M- erweitern werden, um somit die Spezifität gegenüber dieser Spaltstelle im Vergleich zu den Trypsin-Spaltstellen zu erhöhen. Dabei würde jedoch der Methioninrest als neuer N-Terminus zurückbleiben.

Eine Veränderung der Erkennungssequenz zu DDDDR in Kombination mit den oben genannten zusätzlichen Mutationen in EK-Trypsin, welche die Affinität für Arginin in der P1-Position erhöhen, könnte die Spezifität gegenüber anderen potentiellen Spaltstellen erhöhen. Ebenso scheint die Aminosäurereihenfolge SGDR eine Enteropeptidase-Erkennungssequenz darzustellen, da die katalytische Effizienz von Enteropeptidase für ein solches Peptid um 5 - 17-fach höher als für die DDDDK-Sequenz ist (Boulware und Daugherty, 2006). Bei einem Nichtvorhandensein dieser SGDR-Sequenz im Zielprotein könnte die Insertion dieser anstelle von DDDDK zu einer Erhöhung der katalytischen Effizienz von EK-Trypsin gegenüber der Erkennungssequenz führen.

Schlussfolgernd muss man sagen, dass für die Verwendung des generierten EK-Trypsins und der damit verbundenen Spezifität gegenüber Enteropeptidase-Erkennungssequenzen jedes einzelne Zielprotein auf seine Proteasestabilität (Folgeabbau) getestet werden muss. Bei vorhandener Stabilität des Zielproteins stellt EK-Trypsin einen kostengünstigen Ersatz zu kommerzieller Enteropeptidase dar. Eine weitere Reduzierung der Wildtyp-Trypsinaktivität durch rationales, strukturbasiertes Enzymdesign oder durch gerichtete Evolution (Stemmer und Holland, 2003) könnte die Spezifität **EK-Trypsin** gegenüber von Enteropeptidase-Erkennungssequenzen weiter erhöhen.

4.2 Trypsiligase

Wie bereits beschrieben können Ezyme praktisch alle metabolischen Reaktionen mit einer hohen Substratspezifität und Stereoselektivität katalysieren (Sterner, 2011), jedoch sind bis dato aus der Natur nicht für alle möglichen Reaktionen Enzyme gefunden worden. Vor allem bei Reaktionen, die energetisch ungünstig sind (wie z. B. die Peptid-Ligation; endotherme Reaktion), sind die Gegenreaktionen (Hydrolyse; exotherme Reaktion) begünstigt. Die Suche nach Enzymen mit neuen Reaktionen oder neuen Spezifitäten ist in der Wissenschaft dahingehend von Interesse, als dass somit das Repertoire an Produkten und Verbindungen vergrößert werden kann, welche wiederum nützliche *targets* für die Wirkstoffmedizin wie z. B. für die Entwicklung neuer Antibiotika darstellen könnten. Andererseits könnten enzymatische Reaktionen chemische Reaktionen, die nur aufwendig durchführbar sind und mit der Bildung von vielen Nebenprodukten einhergehen, ersetzen oder verbessern. So konnten Phospholipasen mit ihrer Fähigkeit zur Transphosphatidylierung genutzt werden, um neue Phospholipide und -analoge (wie z. B. Cardiolipine) herzustellen, bei denen die Herstellung aufgrund der Komplexität der chemischen Synthese schwierig ist (Dippe *et al.*, 2008; Müller *et al.*, 2012).

Bei Proteasen, die neben der Hydrolyse von Peptidbindungen auch zur Peptid-Ligation befähigt sind, ist ein Ziel der Wissenschaft, diese für die Knüpfung von Peptiden bzw. Peptidanalogen zu nutzen, um so chemische Synthesen mit ihren teils komplizierten Schutzgruppenstrategien oder niedrigen Ausbeuten zu ersetzen oder neue Substrate für anschließende chemischen Synthesen zu generieren. Ebenso besteht ein großes Interesse darin, Proteasen in industriellen Prozessen einsetzen zu können und somit diese Prozesse effektiver, kosteneffizienter oder umweltschonender zu machen. Im Jahre 2005 waren nur zwei Prozesse (die Produktion von Aspartam und die Konvertierung von Schweine- in Menscheninsulin) bekannt, in denen Proteasen zur Peptid-Ligation eingesetzt wurden (Lombard et al., 2005). Um die Anzahl der Proteasen, die für solche Prozesse eingesetzt werden könnten, zu erhöhen, wird in verschiedenste Richtungen geforscht. So stellt neben der Suche nach Proteasen mit hohen oder neuen P1- und P1'-Spezifitäten das protease engineering einen Ansatz dar, der zur Verbesserung von enzymvermittelten Peptid-Ligationen führen soll (Lombard et al., 2005) (die Entwicklung von mimetischen Substraten, die Veränderung des physikalischen Zustands der Reaktanden und die Modifizierung der experimentellen Bedingungen sind weitere Gebiete). Dabei werden die Proteasen so verändert, dass die Peptid-Ligation gegenüber der Hydrolyse begünstigt ist und die Spezifitäten erweitert wurden.

Auf der Suche nach Proteasen mit neuen bzw. hohen P1-Spezifitäten wurde z.B. eine Endopeptidase aus Bacullus licheniformis entdeckt, die die Bildung von Glu-Xaa- oder Asp-Xaa-Bindungen katalysiert (Haensler et al..2000), wobei erstmals Protease-vermittelte Ligation von zwei sauren Aminosäuren gezeigt werden konnte. Des Weiteren konnte die Endopeptidase Pro-C aus Flavobacterium meningosepticum separiert werden, die die Peptid-Ligation mit Prolinresten in der P1-Position mit einer Vielzahl anderer Aminosäuren katalysiert (Haensler und Jakubke H.D., 1998). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit der Metalloprotease Pseudolysin aus Pseudomonas aeruginosa N-geschützte Dipeptide synthetisiert werden können, wobei im Vergleich zu Thermolysin bei der Verwendung von Pseudolysin Tyrosine und Tryptophane als Acylakzeptoren verwendet werden konnten (Pauchon et al., 1993), d. h. mit dieser Protease neue Spezifitäten erhalten wurden und somit neue Produkte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die initiale Geschwindigkeit der Peptid-Ligation in Pseudolysin im Vergleich zu Thermolysin 100-fach höher ist (Rival et al., 1999).

Hinsichtlich des protease engineering konnten neben den bereits beschriebenen Mutationen in Subtilisin, die zur Generierung von "Subtiligase" führten (siehe 1.6.2), weitere Proteasen durch Mutationen der katalytischen Triade so manipuliert werden, dass diese zur Peptid-Ligation befähigt sind. Bei der Protease B (eine Trypsin-ähnliche Serinprotease) aus Streptomyces griseus wurde der aktive Serinrest gegen Glycin oder Alanin ausgetauscht, so dass die Peptid-Ligation von Peptiden mit Thioester- oder Ester-aktivierten Acyldonatoren durchführen kann (Elliott et al., 2000). Weitere Mutationen in diesem Enzym führten zu einer thermostabilen, denaturansresistenten Peptid-Ligase, welche als "Streptoligase" bezeichnet wird (Joe et al., 2004). Eine Neutrale Protease aus Bacillus stearothermophilus, in die eine zusätzliche Disulfidbrücke und weitere Mutationen in einen oberflächenexponierten loop eingefügt wurden, kann die Peptid-Ligation bei Temperaturen bis 70 °C mit moderaten Ausbeuten um die 15% durchgeführt werden (Kühn et al., 2002). In Trypsin führten die Mutationen Asp189Ser bzw. Asp189Ala/Ser190Ala zu einer dramatischen Verringerung der Hydrolyseaktivität (Grünberg et al., 2000), was die Peptid-Ligation in Gegenwart von Substratmimetika erlaubte (Bordusa, 2002b). Mit der Mutation Asp189Glu in Trypsin konnte gezeigt werden, dass diese Enzymvariante nun Lys- oder Arg-enthaltende Peptide mit Ausbeuten von über 50% ligieren kann (Xu et al., 2001). Mit der durch Mutationen in Trypsin generierten Trypsiligase (siehe 1.6.2) können nun unter Verwendung von

Substratmimetika Peptidbindungen N-terminal von einer Arg-His-Sequenz geknüpft werden, wobei quantitative Ausbeuten erreicht werden (Liebscher, 2007).

Das Wissen über den Verlauf der enzymvermittelten Peptid-Ligation hinsichtlich der Interaktionen zwischen Acyldonatoren bzw. Substratmimetika oder auch von den Acylakzeptoren mit der Protease ist gering. Strukturelle Analysen auf molekularer Ebene könnten neue Aspekte und somit zum besseren Verstehen der enzymvermittelten Peptid-Ligation beitragen. Da Trypsin hinsichtlich seiner Struktur bestens charakterisiert ist (siehe 1.5.1), können des Weiteren Unterschiede zu den generierten Varianten mit Ligaseaktivitäten wie in diesem Fall Trypsiligase Aussagen zulassen, welche Veränderungen in den Proteasen für die Entwicklung neuer Aktivitäten in Hinsicht auf die Peptid-Ligation notwendig sind. Die erfolgreiche Aufklärung der Struktur von r-Trypsiligase und b-Trypsiligase mittels Röntgenkristallstrukturanalyse sollte in diesem Teil der Dissertation zu einer Erklärung des Mechanismus der durch Trypsin-Varianten durchgeführten Peptid-Ligationen führen.

Zunächst konnte b-Trypsiligase in der trigonaler Kristallform (Kristallform I) kristallisiert werden (3.2.1.1), wobei bereits aus der Literatur bekannte Parameter der Einheitszelle erhalten wurden (Bode und Huber, 1978; Stubbs et al., 2002). Weiterhin kristallisierte b-Trypsiligase bei der gleichen Proteinkonzentration ähnlichen unter Kristallisationsbedingungen auch in einer orthorhombischen Kristallform (Kristallform II). Dabei besaßen diese Kristalle Zellparameter (siehe Anhang A.3), die bisher für orthorhombische Trypsinkristalle noch nicht bekannt waren (Renatus et al., 1998; Stubbs et al., 2002). Die Strukturen von b-Trypsiligase waren sowohl für die Kristallform I wie auch für Kristallform II identisch, so dass aufgrund der höheren Auflösung nur noch die Kristallform I der ligandfreien b-Trypsiligase betrachtet wurde.

Wie die Analyse der RMSD-Werte der Cα-Atome der Kristallform I von b-Trypsiligase zeigten, unterschieden sich diese nur geringfügig von den Positionen der identischen Atome in Wildtyp-Trypsin (Abbildung 3.9). Jedoch ist in den für b-Trypsiligase gefunden Kristallformen I und II keine eindeutige Elektronendichte für die Bereiche der Aktivierungsdomäne (siehe 1.5.2) erkennbar (Abbildung 3.8 A). Das Nichtvorhandensein einer Elektronendichte in einer Röntgenkristallstruktur kann durch die Flexibilität der entsprechenden Region hervorgerufen werden. So ist für Trypsin bekannt, dass die Segmente der Aktivierungsdomäne im Zymogen, dem Trypsinogen, flexibel sind und erst durch die Aktivierung und anschließende Ausbildung der "begrabenen Salzbrücke" zwischen dem

neuen N-Terminus Ile16 und dem Asp194 eine starre, aktive Konformation einnehmen (Huber und Bode, 1978; Pasternak *et al.*, 1999). Diese Flexibilität der Aktivierungsdomäne von Trypsinogen konnte auf struktureller Ebene vor mehreren Jahrzehnten bereits nachgewiesen werden; so fand man entsprechend keine eindeutige Elektronendichte für die entsprechenden Regionen (Kossiakoff *et al.*, 1977; Fehlhammer *et al.*, 1977; Walter *et al.*, 1982).

Dies suggeriert, dass durch die Substitution der vier Aminosäurereste in Trypsiligase die Gesamtstruktur weg von einem aktiven hin zu einem inaktiven, zymogenen Zustand verschoben wurde bzw. ein Gleichgewicht zwischen beiden Zuständen vorliegt. Die Vermutung eines Gleichgewichts wird durch die identifizierten alternativen Konformationen des Asp194 in der Kristallform I von b-Trypsiligase gestützt. Dabei weist die erste Konformation des Asp194 Parallelen zu der im (aktiven) Trypsin gefundenen Konformation auf, wohingegen die alternative Konformation von Asp194 der des (inaktiven) Trypsinogens ähnelt (Abbildung 3.10). Ein weiterer Aspekt, der für ein Gleichgewicht zwischen aktivem und zymogenem Zustand und nicht für eine vollständige Verschiebung zum zymogenen Zustand in Trypsiligase spricht, ist die Hydrolyseaktivität von Trypsiligase. Beim Vergleich von Wildtyp-Trypsinen mit Wildtyp-Trypsinogenen konnten 10⁻⁷- bis 10⁻⁸-fache Unterschiede in der Aktivität zwischen dem aktiven und inaktiven Zustand bestimmt werden (Bode, 1979; Pasternak et al., 1999). Für Trypsiligase konnte eine katalytische Effizienz von $3.4 \times 10^2 \, \text{M}^{\text{-1}} \, \text{s}^{\text{-1}}$ gegenüber dem Substrat Bz-AAYRHAAG-OH bestimmt werden (Liebscher, 2007). Wildtyp-Trypsin hingegen weist für Peptidsubstrate meist eine katalytische Effizienz im Bereich von $10^6 \,\mathrm{M}^{-1}\,\mathrm{s}^{-1}$ auf, so liegt sie für Pefachrome tPA bei $5.2 \times 10^6 \,\mathrm{M}^{-1}\,\mathrm{s}^{-1}$ (Auerswald, 2011). Der Verringerung der Hydrolyseaktivität, die durch die Mutationen erreicht wurde, liegt für Trypsiligase im Vergleich zu Trypsin in einem Bereich von 10⁻⁴. Diese im Vergleich zu Trypsinogen, erhöhte Hydrolyseaktivität deutet auf einen Zustand in Trypsiligase hin, der aktiver als der reine zymogene Zustand in Trypsinogen ist und somit möglicherweise auch auf ein strukturelles Gleichgewicht zwischen aktiver und zymogener, inaktiver Konformation.

B-Trypsiligase zeigte auch bei niedrigeren Proteinkonzentrationen eine Kristallbildung in der orthorhombischen Kristallform (Kristallform III), wobei die erhaltenen Zellparameter bereits in der Literatur beschrieben sind (Renatus *et al.*, 1998). In der Kristallform III konnten bis auf Ile16 und Val17 die Positionen aller Aminosäurereste aufgrund der vorhandenen Elektronendichte ermittelt werden, was wie unter 3.2.1.2 gezeigt den *autolysis loop*

(Gly142 - Pro152), den *surface loop* I (Gly184 - Gly193) und den *surface loop* II (Gly216 - Asn223) der Aktivierungsdomäne einschließt. Die Analyse dieser Struktur und der Vergleich zur Struktur des Wildtyp-Trypsins zeigt, dass b-Trypsiligase in der Kristallform III in einem zymogenähnlichen Zustand vorliegt. So weist die Konformation des Asp194 in der Orientierung zur Zymogentriade ebenso auf einen trypsinogenen Zustand hin wie das daraus resultierende Nichtvorhandensein der "begrabenen Salzbrücke" vom Asp194 zu Ile16.

Die Kristallform III von b-Trypsiligase stellt somit, im Gegensatz zu den bekannten Strukturen von Trypsinogen (Kossiakoff et al., 1977; Walter et al., 1982), eine erste Struktur einer Trypsinogen-ähnlichen Konformation dar, bei der für eine Trypsin-Variante die Elektronendichten der entsprechenden Segmente sichtbar sind und damit eine Orientierung der Aktivierungsdomäne identifiziert werden konnte. Die Kristallform III ist unter Berücksichtigung der Kristallform I und II (3.2.1.1) nicht die ausschließlich in Lösung vorhandene Spezies von b-Trypsiligase, sondern stellt eine Grenzkonformation bei einem möglichen Gleichgewicht zwischen inaktiver, zymogener und der aktiven Konformation dar. Diese Grenzkonformation wird vermutlich durch Kristallkontakte einem symmetrieverwandten Molekül von b-Trypsiligase eingenommen (Abbildung 3.19), wobei vor allem die Aminosäurereste des autolysis loops mit dem symmetrieverwandten Molekül interagieren (siehe Anhang A.6). Durch die bereits bekannte Kooperativität der oberflächenexponierten loop-Regionen, welche in Trypsin-ähnlichen Serinproteasen mit dem entsprechenden Trypsin-fold vorhanden sind (Page und Di Cera, 2010), werden dann vermutlich ebenso die surface loops I und II sowie das N-terminale Segment in den zymogenen Zustand dieser Kristallform III der b-Trypsiligase gezogen.

Durch die Position der künstlichen Metallbindestelle im *autolysis loop* in der Kristallform III konnte die Bindung von Zn²⁺-Ionen in b-Trypsiligase durch *soaking* Experimente bewiesen werden, wie dies ebenso schon für N143H/E151H-Trypsin im Komplex mit A86H-Ecotin gezeigt wurde (Brinen *et al.*, 1996). Die Analyse der Metallbindestelle im zinkgebundenen Zustand zeigt dabei eine Koordinationszahl des Zn²⁺-Ions von mindestens vier, wobei neben den beiden Histidinen der b-Trypsiligase und dem Lys87# aus dem symmetrieverwandten b-Trypsiligase-Molekül mindestens ein Wassermolekül an der Koordination des Zn²⁺-Ions beteiligt ist. Die Koordinationszahl von vier wurde für die Zinkbindung an dieser künstlichen Metallbindestelle zwar vermutet, konnte durch andere strukturelle Analysen jedoch nicht bestätigt werden (Brinen *et al.*, 1996). Dabei ist zu beachten, dass die Trypsin-Variante bei Brinen *et al.* (1996) mit einem makromolekularen Inhibitor kristallisiert wurde, wohingegen die Kristallform III von b-Trypsiligase eine ligandfreie Struktur ist. Möglicherweise ist in der

zinkgebundenen Kristallform III von b-Trypsiligase die Positionierung im Vergleich zum substrat- bzw. im inhibitorgebundenen Zustand wie im Fall von Brinen et~al.~(1996) aufgrund der Kristallpackung verändert, so dass in diesem Fall eine Zugänglichkeit für ein Wassermolekül an dieser Stelle besteht. Dafür spricht ebenso die für Zn^{2+} -Ionen ermittelte apparente Dissoziationskonstante von $K_D = 54~\mu M$ für die Metallbindestelle in N143H/E151H-Trypsin (Willett et~al.,~1995). Diese Bindungskonstante ist mit einer Zweifachbindung am Metallion verbunden oder mit einer nicht optimalen Geometrie eines dritten Histidins, was in einer niedrigen Affinität zum Zn^{2+} -Ion resultiert. Deshalb muss davon ausgegangen werden, dass im substratgebunden Zustand von Trypsiligase, in dem das Zn^{2+} -Ion neben den zwei Histidinen von Trypsiligase durch einen dritten Histidinrest des Substrats komplexiert wird, das Metallion nur dreifach koordiniert vorliegt.

Die Struktur von r-Trypsiligase in der Kristallform IV (3.2.1.3) zeigt ebenfalls für die Segmente der Aktivierungsdomäne eine eindeutig Elektronendichte. Dabei verdeutlicht diese Struktur, dass neben der Grenzstruktur des zymogenähnlichen Zustandes (Kristallform III, 3.2.1.2) auch eine Grenzstruktur von Trypsiligase im aktivähnlichen Zustand möglich ist. Die Kristallform IV der r-Trypsiligase weist dabei die Merkmale des aktiven Trypsins auf. So konnte neben der eindeutig ausgebildeten "begrabenen Salzbrücke" zwischen Ile16 und Asp194 (Abbildung 3.27) auch die S1-Bindetasche identifiziert werden (Abbildung 3.31), welche in den Zymogenen der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen nicht ausgebildet ist (siehe 1.4.3). Durch die Umorientierung des Polypeptidrückgrates (Abbildung 1.6) bei der Ausbildung der begrabenen Salzbrücke in der aktiven Konformation kommt es damit in der Kristallform IV von r-Trypsiligase zur Ausbildung des Oxyanion-Lochs.

Der Grund für den im Vergleich zu den Kristallformen I - III aktivähnlichen Zustand in der Kristallform IV ist möglicherweise das Dimerisierungsverhalten in der asymmetrischen Einheit. So ist es bereits bekannt, dass flexible Regionen durch Effektoren wie z. B. Substrate, Kofaktoren oder Inhibitoren in andere Konformationen überführt werden können. So konnte bereits für Trypsinogen gezeigt werden, dass die Segmente der Aktivierungsdomäne durch die Inhibierung mit Diisopropylphosphonat (PDB-Code 2TGD) in einen aktivähnlichen Zustand überführt werden können, wobei das Asp194 eine Konformation einnimmt, die der im aktiven Trypsin ähnelt. Auch strukturelle Untersuchungen an Trypsinogen in Gegenwart von BPTI zeigten, dass das Zymogen in eine aktivähnliche Struktur überführt werden kann, wobei das nicht N-terminale Ile16 mit seiner Seitenkette eine ähnliche Position einnimmt, wie dies im aktivem Trypsin der Fall ist (Pasternak *et al.*, 1999).

Im Fall der Kristallform IV von r-Trypsiligase könnte das entsprechende andere Monomer der asymmetrischen Einheit den Effektor darstellen. Die Analyse der Interaktionsfläche und den involvierten Aminosäureresten der beiden Monomere zeigt, dass die Segmente der Aktivierungsdomäne mit 9 der insgesamt 18 Wasserstoffbrücken (Anhang A.9) in die Bindung involviert sind. Allein die Anordnung der zwei Monomere mit ihren beiden Metallbindestellen im *autolysis loop* um ein Zn²⁺-Ion verdeutlicht die Interaktion zwischen den Monomeren. Das entsprechende zweite Monomer besetzt mit seinen Histidinen 143 und 151 die dritte bzw. vierte Koordination am Zn²⁺-Ion und mimt somit möglicherweise das Substrat.

Das Vorhandensein eines Monomer-Dimer-Gemisches von r-Trypsiligase in Lösung, konnte mittels analytischer Ultrazentrifugation (3.2.2.5) nachgewiesen werden. Die Dimerisierung von r-Trypsiligase wird dabei durch die artifizielle Metallbindestelle und damit verbunden durch die Anwesenheit von Zn²⁺-Ionen induziert oder verstärkt. Für die Verstärkung der Dimerisierung durch Zn²⁺-Ionen spricht, dass bereits 1999 für die Variante D189S-Rattentrypsin eine Dimerisierung im Kristall festgestellt wurde (Szabo *et al.*, 1999), wobei weiterführende Analysen an dieser Trypsin-Variante jedoch keine Dimerisierung in Lösung zeigten. Da Trypsiligase im Vergleich zu D189S-Trypsin (Szabo *et al.*, 1999) über zusätzliche Interaktionen wie auch über die koordinative Metallbindung im *autolysis loop* verfügt (siehe Anhang A.9), ist die Affinität der Monomere bei Trypsiligase zueinander möglicherweise höher, so dass diese mittels analytischer Ultrazentrifugation ermittelt werden konnte.

Das Vorhandensein eines Monomer-Dimer-Gemisches für Chymotrypsin-ähnliche Serinproteasen in Lösung ist für α-Chymotrypsin bereits bekannt (Timasheff, 1969), wobei dieses vor allem im sauren pH-Bereich verstärkt auftritt (Gorbunoff et al., 1978). Bei Trypsin ist die Dimerisierung bisher nur für die oben bereits beschriebene Variante D189S-Trypsin (PDB-Code 1AMH) bekannt. Dabei wurde wie in der Kristallform IV von Trypsiligase auch ein aktivähnlicher Zustand beobachtet, bei dem die S1-Bindetasche deformiert ist. Diese im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin deformierte bzw. veränderte S1-Bindetasche wurde ebenso für die Kristallform IV von r-Trypsiligase beobachtet (Abbildung 3.31 und 3.32). Die Frage, ob die Dimerisierung von D189S-Trypsin (PDB-Code 1AMH) wie auch die von r-Trypsiligase Kristallform IV zur Verformung der S1-Bindetasche führt oder ob die durch die Mutationen verformte S1-Bindetasche die Dimerisierung fördert, konnte nicht geklärt werden. Dabei wurde bei den erhaltenen Strukturen über eine mögliche Kooperativität beider Prozesse spekuliert, wobei die durch den eingeführten Ser189-Rest hervorgerufene strukturelle Umlagerung die Dimerisierung fördert und andererseits die Dimerisierung wiederum die Aktivierungsdomäne hin zu einem strukturellen Übergangszustand drängt (Szabo *et al.*, 1999).

Hinsichtlich der erhaltenen apparenten Dissoziationskonstante des Dimers von Trypsiligase von ca. 70 µM ist darauf hinzuweisen, dass dieser Wert einen Schätzwert darstellt bzw. mit einen großen Fehler behaftet ist (Abbildung 3.37), da genauere Messungen mit höheren Konzentrationen von r-Trypsiligase aufgrund der nicht-Idealität der Proben nicht möglich war (siehe 3.2.2.5). Nichtsdestotrotz weist dieser Wert darauf hin, dass die Dimerisierung mit einer niedrigen Affinität in Lösung vorhanden ist, was die oben beschriebene These der Wechselwirkung der zwei Monomere zueinander und die damit verbundene Überführung in eine aktivähnliche Konformation, wie sie in der Kristallform IV von r-Trypsiligase gefunden wurde, bekräftigt.

Die Kristallstrukturen I - IV von Trypsiligase verdeutlichen, dass ein Gleichgewicht zwischen einem zymogenähnlichen und einem aktivähnlichen Zustand in Abwesenheit des Substrats vorliegt. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu dem angenommenen Modell der irreversiblen Konvertierung, die während der Zymogenaktivierung vonstatten geht (siehe 1.4.3). Dieses Modell, welches nur den inaktiven, zymogenen Zustand des Trypsinogens und den aktiven Zustand des Trypsins beinhaltet, konnte für Trypsin wie auch für andere Proteasen dieser Familie bereits relativiert bzw. erweitert werden.

Die katalytisch hoch aktiven Proteasen Trypsin, C1r und Thrombin stehen nach ihrer Zymogenaktivierung in Kontrast zum Komplementfaktor D und dem Blutgerinnungsfaktor VIIa mit ihrer Möglichkeit einer zymogenähnlichen Form nach deren Aktivierung. So wird angenommen, dass die strukturelle Form des Trypsin-folds sowohl aktive als auch inaktive Konformationen zulässt (Gohara und Di Cera, 2011). NMR Studien (Peterson et al., 2001) wie auch schnelle kinetische Messungen (Gombos et al., 2008) zeigen die Heterogenität des aktiven Zentrums von Trypsin bzw. deren näheren Umgebung. Die Existenz eines allosterischen Gleichgewichts zwischen aktiver und inaktiver Form wurde ebenso für den Blutgerinnungsfaktor VIIa diskutiert (Dickinson et al., 1996; Eigenbrot et al., 2001). Ähnliche Gleichgewichte wurden durch schnelle kinetische Messungen für Thrombin (Bah et al., 2006; Di Cera, 2008), Faktor Xa und aktiviertes Protein C erhalten (Vogt et al., 2010).

Hinsichtlich eines allosterischen Gleichgewichtes wurden bei Thrombin zwei unterschiedliche aktive Konformationen (E, E*) beschrieben, wobei in der Konformation E das aktive Zentrum

zugänglich ist (Pineda et al., 2002; Pineda et al., 2004; Bush-Pelc et al., 2007). Dagegen ist in der Konformation E* das aktive Zentrum durch eine Umpositionierung des 215 - 217 Segments blockiert (Pineda et al., 2006; Gandhi et al., 2008; Bah et al., 2009). Unter der Verwendung von ligandfreien Strukturen der Trypsin-ähnlichen Proteasen und ihrer Zymogene wurde das Segment 215 - 217 und dessen Konformation als Kriterium für die Analysen der PDB herangezogen (Gohara und Di Cera, 2011). Dabei wurden wie oben bereits für Thrombin beschrieben auch für andere Vertreter der Trypsin-ähnlichen Serinproteasen mehrere Konformationen der aktiven Proteasen (E, E*) und der inaktiven Zymogene (Z, Z*) identifiziert. Damit konnte das Modell der Konvertierung vom inaktiven Zymogen zur aktiven Protease um die Zustände E* und Z*, bei denen das Segment 215 - 217 kollabiert ist und das aktive Zentrum blockiert, erweitert werden (Gohara und Di Cera, 2011). Die Zustände E* - E bzw. Z* - Z befinden sich dabei in einem allosterischen Gleichgewicht, wobei aus beiden inaktiven, zymogenen Zuständen (Z, Z*) die Konversion in die aktiven Zustände (E und E*) erfolgen kann. Dieses Modell mit einem Gleichgewicht zwischen E* und E stellt im Vergleich zum früher angenommenen Modell der irreversiblen Überführung von Zymogen zur aktiven Protease nun einen reversiblen Mechanismus der Regulation der Enzymaktivität von Proteasen in Abwesenheit jeglicher Liganden dar, der sich der irreversiblen Zymogenaktivierung anschließt (Gohara und Di Cera, 2011).

In den erhaltenen Strukturen der Kristallform I - IV für Trypsiligase befindet sich das 215 - 217 Segment zwar immer in der Konformation, bei der das aktive Zentrum geöffnet vorliegt, nichtsdestotrotz zeigen diese Experimente (vor allem durch Enrico Di Cera und Mitarbeiter), dass Trypsin-ähnliche Proteasen in allosterischen Gleichgewichten vorliegen und ineinander überführt werden können, was mit den in den Kristallformen I - IV beobachteten Ergebnisse für Trypsiligase in Einklang steht.

Die Vermutung, dass das Gleichgewicht zwischen der zymogenähnlichen und der aktivähnlichen Konformation von Trypsiligase durch Effektoren auf die Seite der aktivähnlichen Konformation verschoben wird, wurde durch die Kokristallisation mit einem makromolekularen Inhibitor (Pseudo-Substrat) bestätigt (siehe 3.2.3). Da die Kristallisation von r-Trypsiligase und L45Y/L47H-Eglin C, welche in den Interaktionsstudien die höchste Affinität zueinander aufwiesen, nicht in messbaren Kristallen endete, wurde auf YRH-Ecotin (siehe 2.4.4) zurückgegriffen.

Die Kristallisation des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin führte zur Kristallform V in der Raumgruppe P2₁, wobei die vermutete Umlagerung von b-Trypsiligase

(im Vergleich zu Kristallform I - III) hin zum aktivähnlichen Zustand z. B. an der Konformation des Asp194 zu erkennen ist (Abbildung 3.44). Es ist trotz gebundenem Pseudo-Substrats, was der Inhibitor YRH-Ecotin aufgrund seiner im reactive site loop (siehe 1.3) enthaltenen YRH-Sequenz darstellt, auffällig, dass die Segmente der Aktivierungsdomäne weiterhin eine hohe Flexibilität besitzen. Diese Flexibilität könnte möglicherweise dadurch eingeschränkt werden, indem der Kofaktor Zink, welcher in der Metallbindestelle sowohl von Trypsiligase als auch YRH-Ecotin komplexiert wird, in sättigenden Konzentrationen zugegeben wird. So wurde für die Variante N143H/E151H-Rattentrypsin im Komplex mit A86H-Ecotin bereits beschrieben, dass die Elektronendichte des kompletten autolysis loops erst nach einem soak mit den entsprechenden Metallion (Ni²⁺, Cu²⁺ oder Zn²⁺) sichtbar wurde (Brinen et al., 1996).

Die Richtigkeit dieser Aussage kann kontrovers diskutiert werden, da die Differenzen zwischen den R_{cryst} - und R_{free} -Wert (siehe 2.8.4) in den Strukturen von Brinen *et al.* (1996) mit Werten zwischen 7,4 - 9,4% recht hoch sind, was möglicherweise für einen Modellbias der Strukturen sprechen könnte. Aufgrund der fehlenden Strukturfaktoramplituden für diese PDB-Einträge kann diese Vermutung jedoch nicht überprüft werden. Weiterhin ist aber in der Kristallform V des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin ersichtlich, dass in der Kette B von b-Trypsiligase (mit der Kette F von YRH-Ecotin), welche an ihrer Metallbindestelle ein Zn^{2+} -Ion koordinativ gebunden hat (Abbildung 3.50 A), ebensowenig die Elektronendichte für den restlichen Teil des *autolysis loops* vorhanden ist. Dies spricht für eine weitere die Flexibilität des *autolysis loops* trotz der Bindung des Kofaktors Zink und dem Pseudo-Substrat. Andererseits kann durch den hohen B-Faktor (siehe Anhang A.10) des Zn^{2+} -Ions angenommen werden, dass die Metallbindestelle entweder nicht vollständig besetzt ist oder an dieser Metallbindestelle möglicherweise ein anderes Metallion gebunden ist, wodurch der *autolysis loop* nicht in eine starre Konformation verschoben wird und damit verbunden auch keine Elektronendichte erkennbar ist.

In den Kristallstrukturen von *simian immunodeficiency virus* (SIV) Protease-Mutanten, welche Resistenzen gegenüber verwendeten Wirkstoffen aufweisen, wurden ebenfalls flexible Domänen gefunden (Rose *et al.*, 1998). Diese Domänen erfahren erst durch die Bindung eines Inhibitors (in diesem Fall ist das Effektormolekül das Produktpeptid) eine Konformationsänderung in zu einer starren Position (Rose *et al.*, 1996). Die Allosterie, wie eine Konformationsänderung durch Effektormoleküle genannt wird, geht definitionsgemäß mit einer Beeinflussung des aktiven Zentrums, hervorgerufen durch die Änderung der Konformation, einher. Im Fall von Trypsiligase wird vor allem die Konformation der

Substratbindetaschen, welche gleichzeitig Teile der Aktivierungsdomäne sind, beeinflusst und verändert. Diese Substratbindetaschen insbesondere die S1-Bindetasche, stehen im direkten Zusammenhang mit der Erkennung der Substrate und damit verbunden der katalytischen Effizienz der hydrolytischen Spaltung und im Fall von Trypsiligase auch der der Peptid-Ligation.

Hinsichtlich der S1-Bindetasche, welche durch die Einführung des Lysins (Asp189Lys) in der ligandfreien Kristallform IV deformiert vorliegt, zeigt sich diese Deformierung ebenso in der Kristallform V aus dem Komplex von b-Trypsiligase und YRH-Ecotin. Dabei zeigen vor allem die Aminosäurereste des surface loops II, die Teil der S1-Bindetasche sind, mit RMSD-Werten von max. 7 Å zum Wildtyp-Trypsin größere Abweichungen als zu den analogen Aminosäureresten der r-Trypsiligase der Kristallform IV mit RMSD-Werten von max. 2 Å (Vergleich Abbildung 3.40 A und Abbildung 3.42 B). Diese Deformierung im inhibitorgebundenen Zustand ist insofern neu, als dass bisherige strukturelle Analysen an Trypsin-Varianten gezeigt haben, dass durch die Inhibitorbindung eine konformationelle Änderung stattfindet, die die S1-Bindetasche in eine Konformation überführt, die der des Wildtyp-Trypsins entspricht (Szabo et al., 1999; Pasternak et al., 1999; Pasternak et al., 2001). So besitzt die Struktur von D189S-Trypsin ohne Inhibitor wie oben bereits beschrieben eine deformierte S1-Bindetasche (Szabo et al., 1999). Im Komplex mit BPTI hingegen liegt die S1-Bindetasche in einer Form vor, die der Wildtyp-Trypsins entspricht (Perona et al., 1994). Der Grund für die weiterhin deformierte S1-Bindetasche in Trypsiligase könnte dabei eine sterische Behinderung des surface loops II durch die D189K-Substitution sein (Abbildung 3.41). Die Seitenkette des Lys189 in Trypsiligase ragt in die S1-Bindetasche hinein und blockiert damit die Position, die sonst Teile der Aminosäurereste des surface loops II in Wildtyp-Trypsin oder in anderen inhibitorgebundenen Trypsin-Varianten einnehmen. Andererseits könnte der induced fit-Mechanismus durch die Interaktion mit dem bevorzugten Tyrosinrest in der P1-Position der Grund für die weiterhin deformierte S1-Bindetasche sein, wobei in dieser Konformation die idealen Wechselwirkungen zwischen Protease und Substrat zustande kommen.

Um zu klären, wie die Erkennung der von Trypsiligase bevorzugten YRH-Sequenz am Enzym erfolgt und welche Aminosäurereste der Trypsiligase in die Interaktionen mit den Substratresten involviert sind, wurden die entsprechenden Regionen in der Kristallform V des Komplexes aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin genauer betrachtet. Allgemein ist erkennbar, dass die Interaktionen in der erhaltenen Kristallform V gut mit dem auf Strukturdaten basierenden Modell (Abbildung 1.12) übereinstimmen. Auffällig ist dabei jedoch, dass der

P1-Tyrosinrest wenige bzw. keine starken Interaktionen zu den Aminosäureresten der S1-Bindetasche besitzt (Abbildung 3.47 B). Möglicherweise wird dieser Aminosäurerest in der P1-Position aufgrund der Deformation der S1-Bindetasche, hervorgerufen durch die D189K-Substitution, nach dem induced fit-Mechanismus bevorzugt. Dabei würde man vermuten, dass ein Phenylalaninrest aufgrund seiner Ähnlichkeit in der Größe der Seitenkette eine ähnliche Erkennung durch Trypsiligase aufweist. Tatsächlich zeigen Aktivitätsmessungen mit Peptidsubstraten, dass die initiale Hydrolysegeschwindigkeit bei Substraten mit einen Phenylalaninrest 45% von der beträgt, die mit einem Tyrosinrest an der P1-Position gemessen wurden (Liebscher, 2007). Andererseits könnten die beobachteten hydrophoben Wechselwirkungen (Anhang A.12) einen größeren Einfluss auf die Selektivität des P1-Restes haben als die beobachteten Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 3.47 B). Bezüglich der Interaktion zwischen der S1'-Bindetasche und dem P1'-Arginin war bereits bekannt, dass mit der Einführung eines Glutaminsäurerestes an der Position 60 des Trysins basische Aminosäurereste in P1'-Position bevorzugt werden, wobei K60E-Trypsin eine Präferenz gegenüber dibasischen Aminosäuresequenzen an der P1- und P1'-Position besitzt (Kurth et al., 1998). Die Strukturanalysen des Komplexes von b-Trypsiligase und YRH-Ecotin (Kristallform V) bestätigen die direkte elektrostatische Interaktion zwischen der negativ geladenen Glutaminsäurerest aus der S1'-Bindetasche in Trypsiligase und dem positiv geladenen Argininrest an der P1'-Position des Inhibitors YRH-Ecotin (Abbildung 3.48 B). Aufgrund von Aktivitätsmessungen, bei denen mit Peptidsubstraten mit Lys in P1'-Position 60% der initialen Hydrolysegeschwindigkeit im Vergleich zu Peptidsubstraten mit P1'-Arginin detektiert wurden (Liebscher, 2007), kann angenommen werden, dass auch Lys direkt über elektrostatische Wechselwirkungen mit Glu60 in Trypsiligase interagiert. Die Analyse der S1'- P1'-Kontaktfläche zeigte weiterhin, dass ebenso Carbonylsauerstoffatome des Peptidrückgrates von Trypsiligase über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Seitenkette des Argininrests in Wechselwirkung treten können (Abbildung 3.48 B).

Die künstliche Metallbindestelle in der S2'-Bindetasche von Trypsiligase zeigt im Komplex mit YRH-Ecotin, dass sich alle drei Histidinreste in räumlicher Nähe befinden und miteinander interagieren könnten (Abbildung 3.49 B). Des Weiteren befinden sich das Carbonylsauerstoffatom des Gln192 aus Trypsiligase und der Imidazolring des His86 aus YRH-Ecotin in einem Abstand, in dem eine Wasserstoffbrückenbindung möglich ist. Jedoch ist zu beachten, dass für die vollständige Aktivität von Trypsiligase unabhängig von ihrer Protease- oder Ligaseaktivität Zn²⁺-Ionen notwendig sind (Liebscher, 2007). So kann aufgrund der in Abbildung 3.50 ersichtlichen Interaktionen angenommen werden, dass sich

die Positionen der Histidinreste im zinkgebundenen Zustand ändern um die Koordination des Metallions zu optimieren. Der zinkgebundene Zustand, der nur in einem Komplexmolekül der asymmetrischen Einheit (Kette B und Kette F) beobachtet werden konnte, zeigt eine koordinative Bindung des Zn²⁺-Ions durch drei Liganden. Dieses Ergebnis weicht von der angenommenen Koordination von vier ab, stimmt jedoch mit den bisher bekannten strukturellen Daten der Literatur überein (Brinen *et al.*, 1996).

Die Interaktionsstudien stützen die oben formulierte Vermutung, dass der P1-Rest des Substrats möglicherweise durch eine induced fit-Bindung am meisten zu der Konvertierung von einer zymogenähnlichen Konformation zu einer aktivähnlichen Konformation beiträgt. So zeigen die Analysen, dass ein Histidinrest an der P2'-Position allein nicht ausreicht, um einen stabilen Komplex zwischen Trypsiligase und L45A/L47H-Eglin C auszubilden (3.2.2.3 und 3.2.2.4). Die Interaktionsstudien der entsprechenden Eglin C-Varianten zeigen für die Gelfiltrationsläufe als auch für die ITC Messungen nur in Gegenwart von r-Trypsiligase eine Wechselwirkung beider Proteine. Es ist anzunehmen, dass die Wechselwirkungen zwischen b-Trypsiligase und den Eglin C-Varianten zu schwach sind, um sie mit den gewählten Methoden zu detektieren. Ein unterschiedliches Verhalten in der Affinität und damit verbunden in der Komplexbildung zwischen Isoformen des Trypsins und Inhibitoren ist in der Literatur bereits öfters beschrieben worden. So wurde für BPTI eine Affinität von $K_i = 10^{-13} \text{ M}$ zu Rindertrypsin ermittelt (Vincent und Lazdunski, 1972), wohingegen die Affinität von BPTI gegenüber Rattentrypsin nur $K_i = 10^{-10}$ M beträgt (Hedstrom *et al.*, 1996). Des Weiteren zeigten Analysen von Inhibitorvarianten, dass die Art der Interaktionen zwischen dem Inhibitor und den Isoformen des Trypsins unterschiedlich sein können. Der Trypsininhibitor Ecotin zeigt im unmutierten Zustand mit 0,31 nM für Rindertrypsin und 0,93 nM für Rattentrypsin ähnliche K_i-Werte. Eine Ecotin-Variante, bei der die C-terminalen Aminosäurereste 133 - 142 entfernt wurden, weist für die Inhibierung von Rindertrypsin einen K_i-Wert von 0,72 nM auf, wohingegen für Rattentrypsin ein K_i-Wert von 181,3 nM bestimmt wurde (Yang et al., 1998). Aus diesen Resultaten kann geschlussfolgert werden, dass bei der Inhibierung von Rattentrypsin eine Interaktion mit dem C-Terminus von Ecotin vorhanden sein muss, die bei der Inhibierung von Rindertrypsin nicht vorhanden bzw. für die Inhibierung nicht ausschlaggebend ist.

Die Interaktionsstudien mit r-Trypsiligase zeigen, dass Affinitäten zu Eglin C im unteren mikromolaren bzw. nanomolaren Bereich nur mit solchen P1-Resten vorhanden sind, die eine lange Seitenkette (Lysin- oder Tyrosinrest) besitzen. So konnte in Gegenwart eines Alanins an der P1-Position in L45A/L47H-Eglin C keinerlei Interaktion mit r-Trypsiligase festgestellt

werden (Abbildung 3.36 D und E). Dieser Befund stimmt mit analogen Untersuchungen an entsprechenden Peptidsubstraten überein. So weist die initale Hydrolysegeschwindigkeit von r-Trypsiligase für das Peptid Bz-AAARHAG-OH einen Wert von ca. 0,01 mM min⁻¹ auf, Bz-AAYRHAG-OH mit einer wohingegen das Substratpeptid initialen Hydrolysegeschwindigkeit von 0,2 mM min⁻¹ gespalten wird (Liebscher, 2007). Die Erkennung eines Lysinrestes an der P1-Position durch r-Trypsiligase ist allerdings nicht zu erwarten gewesen, da für analoge Substratmessungen kein Umsatz gegenüber Peptiden mit einen P1-Lysinrest ermittelt werden konnten (Liebscher, 2007). Diese Diskrepanz in den erhaltenen Ergebnissen zeigt, dass bei der Bindung von makromolekularen Inhibitoren an Serinproteasen weitere Interaktionen eine Rolle spielen, die bei der Bindung von relativ kurzen Peptidsequenzen nicht vorhanden sind. So konnten durch röntgenkristallographische Untersuchungen von Komplexen aus verschiedenen Rindertrypsin-Varianten L45K-Eglin C in den entsprechenden Varianten von Trypsin 14 und im L45K-Eglin C 10 Aminosäurereste identifiziert werden, die durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander interagieren (Menzel, 2009). Weiterhin wurden jeweils drei Aminosäurereste in den Interaktionspartnern identifiziert, die Salzbrücken ausbilden. Die ermittelten Kontaktflächen zwischen den Rindertrypsin-Varianten und L45K-Eglin C umfassten dabei ca. 860 - 970 Å² (Menzel, 2009). Das Vorhandensein einer solchen Anzahl an Interaktionen in Gegenwart von den zur Analyse verwendeten Peptiden ist allein aufgrund der Länge der Peptidsequenz unwahrscheinlich. Aufgrund des Aufbaus der S1-Bindetasche in r-Trypsiligase bzw. des eingeführten Lys189 könnte man auch eine Abstoßung des Lys45 als P1-Rest in L45K-Eglin C erwarten (zwei positiv geladene Lysinreste). Jedoch zeigen die Untersuchungen an b-Trypsiligase und YRH-Ecotin (siehe 3.2.3), dass der eingeführte Lysinrest an der Position 189 in Trypsiligase nicht in die Interaktion mit dem P1-Rest (hier Tyrosin) involviert ist (Abbildung 3.47 B). Bei der Komplexbildung zwischen r-Trypsiligase und L45K-Eglin C ist möglicherweise die Distanz für eine Abstoßung zwischen den zwei positiv geladenen Lysinresten zu groß und die Komplexbildung kommt doch zustande.

Die Interaktion eines Inhibitors mit einem Tyrosinrest an seiner P1-Position wie in L45Y/L47H-Eglin C mit r-Trypsiligase war dahingehend zu erwarten, da untersuchte Peptidsubstrate wie Bz-AAYRHAAG-OH oder Bz-AAYRHAG-OH, die die YRH-Sequenz enthalten, mit Abstand die höchste initiale Hydrolysegeschwindigkeit aufwiesen (Liebscher, 2007).

Bei allen durch die ITC Messungen erhaltenen K_D -Werte ist zu erkennen, dass die Affinitäten im Vergleich zu bereits bekannten Komplexbildungen von Trypsin bzw. Trypsin-Varianten

und Eglin C-Varianten niedriger sind. Der K_D -Wert von ca. 10^{-7} M (L45Y/L47H-Eglin C und r-Trypsiligase) liegt dabei um vier Größenordnungen über dem für die Interaktion von Trypsin und L45R-Eglin C (K_i -Wert: $2,5 \times 10^{-11}$ M, Heinz *et al.*, 1992). Dieser Vergleich und die Tatsache, dass für b-Trypsiligase und die Eglin C-Varianten keine Affinitäten ermittelt werden konnten, deuten darauf hin, dass mit den Mutationen in Trypsiligase generell die Affinität für Substrate und Inhibitoren herabsetzt wurde, was die reduzierte Hydrolyseaktivität aufgrund der verringerten Affinität der Substratbindung im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin erklärt.

Aus den für Trypsiligase erhaltenen Strukturdaten kann nun geschlussfolgert werden, dass das Enzym in Abwesenheit von Substraten in einem Gleichgewicht zwischen zymogenähnlichen und aktivähnlichen Konformationen vorliegt. Erst wenn das Substrat mit der entsprechenden YRH-Sequenz anwesend ist, wird Trypsiligase in eine vollständig aktive Konformation überführt, in der die Katalyse möglich ist, da dann sowohl die Substratbindetaschen als auch das Oxyanion-Loch ausgebildet sind (siehe 3.2.3). Aus den erhaltenen Ergebnissen kann nun ein Modell für Trypsiligase erstellt werden (Abbildung 4.1), das die drei möglichen Zustände beinhaltet.

Dabei kann für die hydrolytische Spaltung der YRH-Sequenz nicht ausgeschlossen werden, dass die Substratsequenz bereits von Trypsiligase in der zymogenähnlichen Konformation erkannt und dann direkt in die vollständig aktive Konformation überführt wird und dort das Substrat hydrolysiert. Es kann in dem Fall nicht zwischen einem *induced fit*-Mechanismus, der die direkte Überführung in die aktive Konformation aus der zymogenähnlichen beschreibt, und einer konformationellen Selektivität, bei der das Substrat nur an die aktivähnliche Konformation bindet und dieses dann in die vollständig aktive Konformation überführt, unterschieden werden.

Bei der Peptid-Ligation in Gegenwart eines Substratmimetikums, wie z.B. mit einem Guanidinophenylester gekoppelten Peptid, ist bekannt, dass diese mit zymogenähnlichen Enzymen interagieren können und die Peptid-Ligation durchgeführt werden kann (Rall und Bordusa, 2002). So sind die Varianten D189S/D194N- und K60E/D189S/D194N-Trypsin zymogenähnliche Enzyme, die verschiedene Substratmimetika umsetzen können und damit zur Peptid-Ligation befähigt sind (Rall und Bordusa, 2002). Dabei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei diesen zymogenähnlichen Varianten von Trypsin auch ein Gleichgewicht zwischen zymogenähnlicher und aktivähnlicher Konformation vorliegt, wobei die Erkennung der Susbtratmimetika nur in der aktivähnlichen Konformation stattfindet. Ein

Fakt der für diese These spricht, ist das die in reiner zymogenen Konformation vorliegende Variante K15A-Trypsinogen bei keinen der analysierten Substratmimetika eine Aktivität aufweist. Die Substratmimetika werden von dieser Trypsinogen-Variante nicht als Donorkomponenten für die Peptid-Ligation akzeptiert (Rall und Bordusa, 2002). Es kann also auch für die durch Trypsiligase durchgeführte Peptid-Ligation unter Verwendung eines Substratmimetikums nicht zwischen einem *induced fit*-Mechanismus und einer konformationellen Selektivität unterschieden werden (Abbildung 4.1).

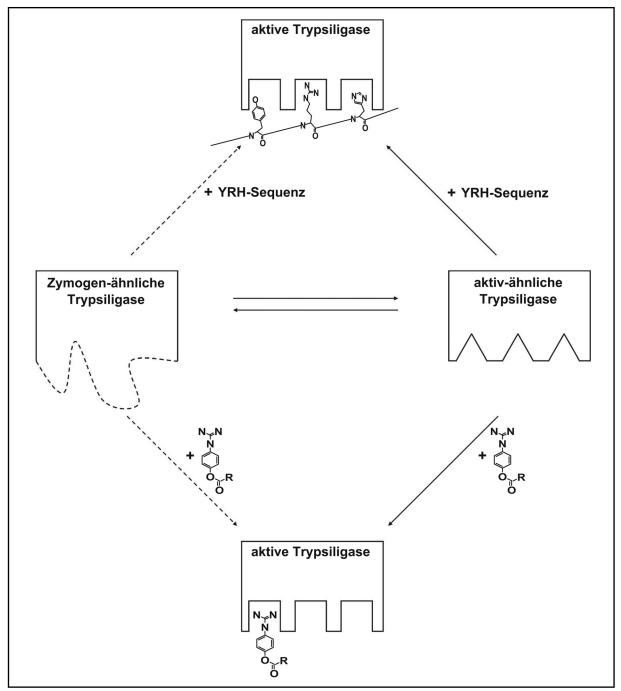


Abbildung 4.1: Postuliertes Modell für Trypsiligase, das die während der Proteolyse und der Peptid-Ligation erhaltenen Konformationen in Ab- und Anwesenheit der Substrate darstellt.

Wenn Trypsiligase nun durch sein Substrat (YRH-Sequenz in der Hydrolyse und Substratmimetika in der Peptid-Ligation) in seine aktive Konformation überführt wird oder das möglicherweise vorliegende Gleichgewicht von zymogenähnlichem und aktivähnlichem Zustand in Richtung aktiver Konformation verschoben wird, dann spricht man von einem *induced fit*-Mechanismus (Koshland, 1958; Koshland, 1963).

Dabei konnte bei der Analyse für die *induced-fit*-Theorie für Enzyme aus verschiedenen Enzymklassen gezeigt werden, dass die kleinsten Konformationsänderungen bei den Hydrolasen (z. B. Proteasen oder Nukleasen) zu beobachten sind, da diese im Allgemeinen Wasser nicht von der Bindestelle ausschließen müssen (Koshland, 1994). Diese Erkenntnis in Zusammenhang mit den erhaltenen Daten für Trypsiligase lässt den Schluss zu, dass Proteasen und Proteasevarianten durch einen *induced-fit*-Mechanismus mit ihren Substraten Wasser aus der Katalyse ausschließen könnten und damit die Peptid-Ligation effektiver ausführen können.

Da ohne das Substrat die für die Katalyse notwendigen funktionellen Gruppen deformiert (z. B. S1-Bindetasche) bzw. gar nicht vorliegen (z. B. Oxyanion-Loch), wird hier für Trypsiligase das *induced-fit*-Modell dahingehend erweitert, dass hier -in Anlehnung an die substratunterstützte Katalyse (*substrate-assisted catalysis*, Carter und Wells, 1987)- von einer *substrataktivierten Katalyse* (*substrate-activated catalysis*) gesprochen werden kann.

Bei der substratunterstützten Katalyse wird eine katalytische Gruppe aus dem Enzym entfernt, was zu einer Verminderung der Aktivität führt. Die partielle Rückgewinnung der Aktivität wird dadurch erreicht, dass die entfernte katalytische Gruppe in das Substrat eingeführt wird und somit während der Reaktion die Katalyse unterstützt (Dall'Acqua und Carter, 2000).

In Trypsiligase ist zwar keine katalytische Gruppe (wie z. B. die katalytische Triade oder das Oxyanion-Loch) entfernt, doch werden diese durch die eingeführten Mutationen deformiert bzw. auseinandergerissen. Erst durch die Gegenwart des Substrates erfahren die katalytischen Regionen, in erster Linie das Oxyanion-Loch, eine Konformationsänderung, wodurch eine aktive Konformation des Enzyms entsteht. Die Fähigkeit des Enzyms zur Katalyse kommt so erst durch das Substrat zustande und ist somit "substrataktiviert".

5 Zusammenfassung

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte mit der generierten Protease EK-Trypsin gezeigt werden, dass die Übertragung der Spezifität anhand des rationalen, strukturbasierten Enzymdesigns möglich ist.

EK-Trypsin ist in der Lage sich innerhalb von 10 min vollständig aus seinem Zymogen selbst zu aktivieren. Gegenüber dem Substrat Trypsinogen weist EK-Trypsin eine im Vergleich zu Enteropeptidase identische Aktivität auf.

Die Substrate DDDDK-RNase A und DDDDK-RNase S zeigen, dass EK-Trypsin im Vergleich zu Enteropeptidase weniger selektiv ist und potentielle Trypsin-Spaltstellen spaltet.

EK-Trypsin deutet das Potential von Trypsin an, dass durch weiteres *protease engineering* maßgeschneiderte Proteasen für spezielle Erkennungssequenzen in Substraten generiert werden können (maßgeschneiderte Peptiderkennungssequenzen-Protease Paare).

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte durch fünf Kristallstrukturen von Trypsiligase nachgewiesen werden, dass diese zur Peptid-Ligation befähigte Trypsin-Variante in einem Gleichgewicht von zymogenähnlicher und aktivähnlicher Konformation vorliegt.

Die Kristallisation in Gegenwart eines makromolekularen Inhibitors (Pseudo-Substrat) verschiebt dieses Gleichgewicht hin zur aktiven Konformation, wobei im Vergleich zu Wildtyp-Trypsin weiterhin eine Deformation der S1-Bindetasche vorliegt. Dadurch konnte geschlussfolgert werden, dass in den durch Trypsiligase katalysierten Reaktionen der Proteolyse und der reversen Proteolyse (Peptid-Ligation) die Substrate bzw. Substratmimetika für die Überführung der Trypsiligase in die aktive Konformation verantwortlich sind und damit die Katalyse selber erst ermöglichen (*substrate-activated catalysis*). Die aus den Strukturdaten erhaltenen Konformationen von Trypsiligase konnten in einem Modell zusammengefasst werden.

Die strukturelle Analyse von Trypsiligase zeigt, dass die Deformierung der Substratbindetaschen in Trypsin-Varianten zu einem Gleichgewicht zwischen zymogen- und aktivähnlichen Konformationen führt. Dadurch sind diese Trypsin-Varianten in Kombination mit dem Konzept der Substratmimetika Enzymvarianten, die die enzymvermittelte Peptid-Ligation im wässrigen System durchführen können.

6 Literaturverzeichnis

Abbenante, G. and Fairlie, D. P. Protease inhibitors in the clinic. Med. Chem. 1(1), 71-104. 2005.

Abrahmsen, L., Tom, J., Burnier, J., Butcher, K. A., Kossiakoff, A., and Wells, J. A. Engineering subtilisin and its substrates for efficient ligation of peptide bonds in aqueous solution. *Biochemistry* 30(17), 4151-4159. 30-4-1991.

Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Jain, S., Kapral, G. J., Grosse Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R. D., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. The Phenix software for automated determination of macromolecular structures. *Methods* 55(1), 94-106. 2011.

Adams, P. D., Grosse-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Read, R. J., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., and Terwilliger, T. C. PHENIX: building new software for automated crystallographic structure determination. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58(Pt 11), 1948-1954. 2002.

Ahmed, F. E. Utility of mass spectrometry for proteome analysis: part I. Conceptual and experimental approaches. *Expert.Rev.Proteomics*. 5(6), 841-864. 2008.

Allende, J. E. and Richards, F. M. The action of trypsin on ribonuclease-S. *Biochemistry* 1, 295-304. 1962.

Araujo, A. P., Oliva, G., Henrique-Silva, F., Garratt, R. C., Caceres, O., and Beltramini, L. M. Influence of the histidine tail on the structure and activity of recombinant chlorocatechol 1,2-dioxygenase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 272(2), 480-484. 7-6-2000.

Arnold, U., Rücknagel, K. P., Schierhorn, A., and Ulbrich-Hofmann, R. Thermal unfolding and proteolytic susceptibility of ribonuclease A. *Eur.J. Biochem.* 237(3), 862-869. 1-5-1996.

Auerswald, H. Herstellung und Charakterisierung Enterokinase-ähnlicher Trypsin-Varianten mit verminderter Hydrolyseaktivität. 2011.

Ausio, J. Analytical ultracentrifugation and the characterization of chromatin structure. *Biophys. Chem.* 86(2-3), 141-153. 30-8-2000.

Bah, A., Carrell, C. J., Chen, Z., Gandhi, P. S., and Di Cera, E. Stabilization of the E* form turns thrombin into an anticoagulant. *J.Biol.Chem.* 284(30), 20034-20040. 24-7-2009.

Bah, A., Garvey, L. C., Ge, J., and Di Cera, E. Rapid kinetics of Na+ binding to thrombin. *J.Biol.Chem.* 281(52), 40049-40056. 29-12-2006.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Chene, C., Winkler, F. K., Guha, A., Konigsberg, W. H., Nemerson, Y., and Kirchhofer, D. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. *Nature* 380(6569), 41-46. 7-3-1996.

Barry, M. and Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat.Rev.Immunol.* 2(6), 401-409. 2002.

Belmouden, A., Le, K. H., Lederer, F., and Garchon, H. J. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA encoding rat kidney long-chain L-2-hydroxy acid oxidase. Expression of the catalytically active recombinant protein as a chimaera. *Eur.J.Biochem.* 214(1), 17-25. 15-5-1993.

Berman, H. M., Battistuz, T., Bhat, T. N., Bluhm, W. F., Bourne, P. E., Burkhardt, K., Feng, Z., Gilliland, G. L., Iype, L., Jain, S., Fagan, P., Marvin, J., Padilla, D., Ravichandran, V., Schneider, B., Thanki, N., Weissig, H., Westbrook, J. D., and Zardecki, C. The Protein Data Bank. *Acta Crystallogr. D.Biol. Crystallogr.* 58(Pt 6 No 1), 899-907. 2002.

Berman, H. M., Bhat, T. N., Bourne, P. E., Feng, Z., Gilliland, G., Weissig, H., and Westbrook, J. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nat.Struct.Biol.* 7 Suppl, 957-959. 2000.

Blow, D.M. (1971). The Enzymes., P.D.Boyer, ed. Academic Press: Boca Raton.

Bode, W. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. II. The binding of the pancreatic trypsin inhibitor and of isoleucine-valine and of sequentially related peptides to trypsinogen and to p-guanidinobenzoate-trypsinogen. *J.Mol.Biol.* 127(4), 357-374. 5-2-1979.

Bode, W., Brandstetter, H., Mather, T., and Stubbs, M. T. Comparative analysis of haemostatic proteinases: structural aspects of thrombin, factor Xa, factor IXa and protein C. *Thromb.Haemost*. 78(1), 501-511. 1997.

Bode, W., Fehlhammer, H., and Huber, R. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1-8 A resolution. I. Data collection, application of patterson search techniques and preliminary structural interpretation. *J.Mol.Biol.* 106(2), 325-335. 15-9-1976.

Bode, W. and Huber, R. Crystal structure analysis and refinement of two variants of trigonal trypsinogen: trigonal trypsin and PEG (polyethylene glycol) trypsinogen and their comparison with orthorhombic trypsin and trigonal trypsinogen. *FEBS Lett.* 90(2), 265-269. 15-6-1978.

Bode, W. and Huber, R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur.J.Biochem.* 204(2), 433-451. 1-3-1992.

Bode, W., Meyer E Jr, and Powers, J. C. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 28(5), 1951-1963. 7-3-1989.

Bode, W. and Schwager, P. The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 A resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0. *J.Mol.Biol.* 98(4), 693-717. 15-11-1975.

Bode, W., Schwager, P., and Huber, R. The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 A resolution. *J.Mol.Biol.* 118(1), 99-112. 5-1-1978.

Bolognesi, M., Gatti, G., Menagatti, E., Guarneri, M., Marquart, M., Papamokos, E., and Huber, R. Three-dimensional structure of the complex between pancreatic secretory trypsin inhibitor (Kazal type) and trypsinogen at 1.8 A resolution. Structure solution, crystallographic refinement and preliminary structural interpretation. *J.Mol.Biol.* 162(4), 839-868. 25-12-1982.

Bordusa, F. Proteases in organic synthesis. Chem. Rev. 102(12), 4817-4868. 2002a.

Bordusa, F. Substrate mimetics in protease catalysis: characteristics, kinetics, and synthetic utility. *Curr.Protein Pept.Sci.* 3(2), 159-180. 2002b.

Bordusa,F. and Jakubke,H.D. (2002). Syntheses of Peptides and Peptidomimetics. In Methods of Organic Chemistry, M.Goodman, A.Felix, L.Moroder, and C.Toniolo, eds. (Stuttgart: Georg ThiemeVerlag), pp. 642-664.

Borsook, H. Peptide bond formation. Adv. Protein Chem. 8, 127-174. 1953.

Boulware, K. T. and Daugherty, P. S. Protease specificity determination by using cellular libraries of peptide substrates (CLiPS). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 103(20), 7583-7588. 16-5-2006.

Brayer, G. D., Delbaere, L. T., and James, M. N. Molecular structure of the alpha-lytic protease from Myxobacter 495 at 2.8 Angstroms resolution. *J.Mol.Biol.* 131(4), 743-775. 15-7-1979.

Brenner, S. The molecular evolution of genes and proteins: a tale of two serines. *Nature* 334(6182), 528-530. 11-8-1988.

Brinen, L. S., Willett, W. S., Craik, C. S., and Fletterick, R. J. X-ray structures of a designed binding site in trypsin show metal-dependent geometry. *Biochemistry* 35(19), 5999-6009. 14-5-1996.

Brumshtein, B., Greenblatt, H. M., Futerman, A. H., Silman, I., and Sussman, J. L. Control of the rate of evaporation in protein crystallization by the 'microbatch under oil' method. *J.Appl.Crystallogr.* 41(Pt 5), 969-971. 1-10-2008.

Brünger, A. T. Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* 355(6359), 472-475. 30-1-1992.

Brzozowski, A. M. and Tolley, S. P. Poly(ethylene) glycol monomethyl ethers - an alternative to poly(ethylene) glycols in protein crystallization. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 50(Pt 4), 466-468. 1-7-1994.

Bush-Pelc, L. A., Marino, F., Chen, Z., Pineda, A. O., Mathews, F. S., and Di Cera, E. Important role of the cys-191 cys-220 disulfide bond in thrombin function and allostery. *J.Biol.Chem.* 282(37), 27165-27170. 14-9-2007.

Carter, P. and Wells, J. A. Engineering enzyme specificity by "substrate-assisted catalysis". *Science* 237(4813), 394-399. 24-7-1987.

Cerovsky, V., Wünsch, E., and Brass, J. Enzymatic semisynthesis of dicarba analogs of calcitonin. *Eur.J.Biochem.* 247(1), 231-237. 1-7-1997.

Chaberek S.Jr. and Martell A.E. Interaction of Divalent Metal Ions with N-Hydroxyethylethylenediaminetriacetic Acid. *J.Am. Chem. Soc.* 77(6), 1477-1480. 1955.

Chang, T. K., Jackson, D. Y., Burnier, J. P., and Wells, J. A. Subtiligase: a tool for semisynthesis of proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91(26), 12544-12548. 20-12-1994.

Chen, V. B., Arendall, W. B., III, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66(Pt 1), 12-21. 2010.

Chun, H., Joo, K., Lee, J., and Shin, H. C. Design and efficient production of bovine enterokinase light chain with higher specificity in E. coli. *Biotechnol.Lett.* 33(6), 1227-1232. 2011.

Chung, C. H., Ives, H. E., Almeda, S., and Goldberg, A. L. Purification from Escherichia coli of a periplasmic protein that is a potent inhibitor of pancreatic proteases. *J.Biol.Chem.* 258(18), 11032-11038. 25-9-1983.

Cohen, G. H., Silverton, E. W., and Davies, D. R. Refined crystal structure of gamma-chymotrypsin at 1.9 A resolution. Comparison with other pancreatic serine proteases. *J.Mol.Biol.* 148(4), 449-479. 5-6-1981.

Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 50(Pt 5), 760-763. 1-9-1994.

Collins-Racie, L. A., McColgan, J. M., Grant, K. L., DiBlasio-Smith, E. A., McCoy, J. M., and LaVallie, E. R. Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in Escherichia coli using the novel secretory fusion partner DsbA. *Biotechnology (N.Y.)* 13(9), 982-987. 1995.

Cooper, A. Thermodynamic analysis of biomolecular interactions. *Curr.Opin.Chem.Biol.* 3(5), 557-563. 1999.

Cooper, A. A. and Stevens, T. H. Protein splicing: self-splicing of genetically mobile elements at the protein level. *Trends Biochem.Sci.* 20(9), 351-356. 1995.

Corey, D. R. and Craik, C. S. An Investigation Into the Minimum Requirements for Peptide Hydrolysis by Mutation of the Catalytic Triad of Trypsin. *Journal of the American Chemical Society* 114(5), 1784-1790. 26-2-1992.

Cottrell, J. S. Protein identification by peptide mass fingerprinting. *Pept.Res.* 7(3), 115-124. 1994.

Crowther R.A. (1972). The fast rotation function. In The Molecular Replacement Method, Rossmann M.G, ed. (New York: NY: Gordon and Breach Science Publishers).

Crowther, R. A. and Blow, D. M. A Method of Positioning A Known Molecule in An Unknown Crystal Structure. *Acta Crystallographica* 23, 544-&. 1967.

Czapinska, H. and Otlewski, J. Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. *Eur. J. Biochem.* 260(3), 571-595. 1999.

Dall'Acqua, W. and Carter, P. Substrate-assisted catalysis: molecular basis and biological significance. *Protein Sci.* 9(1), 1-9. 2000.

Dauter, Z., Dauter, M., de La, Fortelle E., Bricogne, G., and Sheldrick, G. M. Can anomalous signal of sulfur become a tool for solving protein crystal structures? *J.Mol.Biol.* 289(1), 83-92. 28-5-1999.

Davey, M. W., Rommelaere, H., de Boeck, S., Goethals, M., van Damme, J., and Vandekerckhove, J. Trypsin-mediated semisynthesis of salmon calcitonin. *Int.J.Pept.Protein Res.* 45(4), 380-385. 1995.

Davie, E. W., Fujikawa, K., and Kisiel, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30(43), 10363-10370. 29-10-1991.

Davie, E. W. and Neurath, H. Identification of a peptide released during autocatalytic activation of trypsinogen. *J.Biol.Chem.* 212(2), 515-529. 1955.

DeLucas, L. J., Bray, T. L., Nagy, L., McCombs, D., Chernov, N., Hamrick, D., Cosenza, L., Belgovskiy, A., Stoops, B., and Chait, A. Efficient protein crystallization. *J.Struct.Biol.* 142(1), 188-206. 2003.

Di Cera, E. Thrombin. Mol. Aspects Med. 29(4), 203-254. 2008.

Diamandis, E. P., Yousef, G. M., Luo, L. Y., Magklara, A., and Obiezu, C. V. The new human kallikrein gene family: implications in carcinogenesis. *Trends Endocrinol.Metab* 11(2), 54-60. 2000.

Dickinson, C. D., Kelly, C. R., and Ruf, W. Identification of surface residues mediating tissue factor binding and catalytic function of the serine protease factor VIIa. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93(25), 14379-14384. 10-12-1996.

- Dippe, M., Mrestani-Klaus, C., Schierhorn, A., and Ulbrich-Hofmann, R. Phospholipase D-catalyzed synthesis of new phospholipids with polar head groups. *Chem.Phys.Lipids* 152(2), 71-77. 2008.
- Döbeli, H., Andres, H., Breyer, N., Draeger, N., Sizmann, D., Zuber, M. T., Weinert, B., and Wipf, B. Recombinant fusion proteins for the industrial production of disulfide bridge containing peptides: purification, oxidation without concatamer formation, and selective cleavage. *Protein Expr.Purif.* 12(3), 404-414. 1998.
- Dodson, G. and Wlodawer, A. Catalytic triads and their relatives. *Trends Biochem.Sci.* 23(9), 347-352. 1998.
- Dorovska, V. N., Varfolomeyev, S. D., Kazanskaya, N. F., Klyosov, A. A., and Martinek, K. The influence of the geometric properties of the active centre on the specificity of -chymotrypsin catalysis. *FEBS Lett.* 23(1), 122-124. 1-6-1972.
- Earnest, T., Fauman, E., Craik, C. S., and Stroud, R. 1.59 A structure of trypsin at 120 K: comparison of low temperature and room temperature structures. *Proteins* 10(3), 171-187. 1991.
- Eckhard, U., Nüss, D., Ducka, P., Schönauer, E., and Brandstetter, H. Crystallization and preliminary X-ray characterization of the catalytic domain of collagenase G from Clostridium histolyticum. *Acta Crystallogr.Sect.F.Struct.Biol.Cryst.Commun.* 64(Pt 5), 419-421. 1-5-2008.
- Eigenbrot, C., Kirchhofer, D., Dennis, M. S., Santell, L., Lazarus, R. A., Stamos, J., and Ultsch, M. H. The factor VII zymogen structure reveals reregistration of beta strands during activation. *Structure*. 9(7), 627-636. 3-7-2001.
- Elliott, R. J., Bennet, A. J., Braun, C. A., MacLeod, A. M., and Borgford, T. J. Active-site variants of Streptomyces griseus protease B with peptide-ligation activity. *Chem. Biol.* 7(3), 163-171. 2000.
- Emsley, P. and Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr.D Biol. Crystallogr.* 60(Pt 12 Pt 1), 2126-2132. 2004.
- Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66(Pt 4), 486-501. 2010.
- Endrizzi, J. A., Breddam, K., and Remington, S. J. 2.8-A structure of yeast serine carboxypeptidase. *Biochemistry* 33(37), 11106-11120. 20-9-1994.
- Evans, P. Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 62(Pt 1), 72-82. 2006.
- Evnin, L. B., Vasquez, J. R., and Craik, C. S. Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87(17), 6659-6663. 1990.
- Fairlie, W. D., Uboldi, A. D., De Souza, D. P., Hemmings, G. J., Nicola, N. A., and Baca, M. A fusion protein system for the recombinant production of short disulfide-containing peptides. *Protein Expr. Purif.* 26(1), 171-178. 2002.
- Faust, A., Panjikar, S., Mueller, U., Parthasarathy, V., Schmidt, A., Lamzin, V. S., and Weiss, M. S. A tutorial for learning and teaching macromolecular crystallography. *Journal of Applied Crystallography* 41, 1161-1172. 2008.
- Faust, A., Puehringer, S., Darowski, N., Panjikar, S., Diederichs, K., Mueller, U., and Weiss, M. S. Update on the tutorial for learning and teaching macromolecular crystallography. *Journal of Applied Crystallography* 43, 1230-1237. 2010.

- Fehlhammer, H., Bode, W., and Huber, R. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1-8 A resolution. II. Crystallographic refinement, refined crystal structure and comparison with bovine trypsin. *J.Mol.Biol.* 111(4), 415-438. 25-4-1977.
- Fersht, A. R. Conformational equilibria in -and -chymotrypsin. The energetics and importance of the salt bridge. *J.Mol.Biol.* 64(2), 497-509. 14-3-1972.
- Forneris, F., Ricklin, D., Wu, J., Tzekou, A., Wallace, R. S., Lambris, J. D., and Gros, P. Structures of C3b in complex with factors B and D give insight into complement convertase formation. *Science* 330(6012), 1816-1820. 24-12-2010.
- Forsythe, E. L., Snell, E. H., and Pusey, M. L. Crystallization of chicken egg-white lysozyme from ammonium sulfate. *Acta Crystallogr. D.Biol. Crystallogr.* 53(Pt 6), 795-797. 1-11-1997.
- Freer, S. T., Kraut, J., Robertus, J. D., Wright, H. T., and Xuong, N. H. Chymotrypsinogen: 2.5-angstrom crystal structure, comparison with alpha-chymotrypsin, and implications for zymogen activation. *Biochemistry* 9(9), 1997-2009. 28-4-1970.
- Frigerio, F., Coda, A., Pugliese, L., Lionetti, C., Menegatti, E., Amiconi, G., Schnebli, H. P., Ascenzi, P., and Bolognesi, M. Crystal and molecular structure of the bovine alpha-chymotrypsin-eglin c complex at 2.0 A resolution. *J.Mol.Biol.* 225(1), 107-123. 5-5-1992.
- Fynbo, C. H., Lorentsen, R. H., Etzerodt, M., Thogersen, H. C., and Holtet, T. L. Characterization of a recombinant granzyme B derivative as a "restriction" protease. *Protein Expr.Purif.* 39(2), 209-218. 2005.
- Gaboriaud, C., Rossi, V., Bally, I., Arlaud, G. J., and Fontecilla-Camps, J. C. Crystal structure of the catalytic domain of human complement c1s: a serine protease with a handle. *EMBO J.* 19(8), 1755-1765. 17-4-2000.
- Gallagher, T., Gilliland, G., Wang, L., and Bryan, P. The prosegment-subtilisin BPN' complex: crystal structure of a specific 'foldase'. *Structure*. 3(9), 907-914. 15-9-1995.
- Gandhi, P. S., Chen, Z., Mathews, F. S., and Di Cera, E. Structural identification of the pathway of long-range communication in an allosteric enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 105(6), 1832-1837. 12-2-2008.
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., and Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In The Proteomics Protocols Handbook, John M. Walker, ed. Humana Press, pp. 571-607.
- Gill, S. C. and von Hippel, P. H. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal.Biochem.* 182(2), 319-326. 1-11-1989.
- Gohara, D. W. and Di Cera, E. Allostery in trypsin-like proteases suggests new therapeutic strategies. *Trends Biotechnol.* 29(11), 577-585. 2011.
- Gombos, L., Kardos, J., Patthy, A., Medveczky, P., Szilagyi, L., Malnasi-Csizmadia, A., and Graf, L. Probing conformational plasticity of the activation domain of trypsin: the role of glycine hinges. *Biochemistry* 47(6), 1675-1684. 12-2-2008.
- Gorbunoff, M. J., Fosmire, G., and Timasheff, S. N. Low pH dimerization of chymotrypsin in solution. *Biochemistry* 17(19), 4055-4065. 19-9-1978.
- Graf, L., Jancso, A., Szilagyi, L., Hegyi, G., Pinter, K., Naray-Szabo, G., Hepp, J., Medzihradszky, K., and Rutter, W. J. Electrostatic complementarity within the substrate-binding pocket of trypsin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 85(14), 4961-4965. 1988.

Gros, P., Milder, F. J., and Janssen, B. J. Complement driven by conformational changes. *Nat.Rev.Immunol.* 8(1), 48-58. 2008.

Grünberg, R., Domgall, I., Günther, R., Rall, K., Hofmann, H. J., and Bordusa, F. Peptide bond formation mediated by substrate mimetics. Structure-guidedoptimization of trypsin for synthesis. *Eur.J.Biochem.* 267(24), 7024-7030. 2000.

Gutfreund, H. [Wilhelm Friedrich Kuhne: an appreciation]. FEBS Lett. 62(SUPPL), E1-12. 4-2-1976.

Häcker, H. G., Sisay, M. T., and Gutschow, M. Allosteric modulation of caspases. *Pharmacol.Ther.* 132(2), 180-195. 2011.

Haensler, M. and Jakubke H.D. Endoproteinase Pro-C-catalyzed peptide bond formation in frozen aquenous systems. *Enzyme and Microbial Technology* 22(7), 617-620. 1998.

Haensler, M., Wissmann, H. D., and Wehofsky, N. Enzymatic formation of Glu-Xaa and Asp-Xaa bonds using Glu/Asp-specific endopeptidase from Bacillus licheniformis in frozen aqueous systems. *J.Pept.Sci.* 6(8), 366-371. 2000.

Hanlon, D. P., Watt, D. S., and Westhead, E. W. The interaction of divalent metal ions with tris buffer in dilute solution. *Anal.Biochem.* 16(2), 225-233. 1966.

Hedstrom, L. Serine protease mechanism and specificity. Chem. Rev. 102(12), 4501-4524. 2002.

Hedstrom, L., Farr-Jones, S., Kettner, C. A., and Rutter, W. J. Converting trypsin to chymotrypsin: ground-state binding does not determine substrate specificity. *Biochemistry* 33(29), 8764-8769. 26-7-1994.

Hedstrom, L., Lin, T. Y., and Fast, W. Hydrophobic interactions control zymogen activation in the trypsin family of serine proteases. *Biochemistry* 35(14), 4515-4523. 9-4-1996.

Hedstrom, L., Szilagyi, L., and Rutter, W. J. Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* 255(5049), 1249-1253. 6-3-1992.

Hefti, M. H., Van Vugt-Van der Toorn CJ, Dixon, R., and Vervoort, J. A novel purification method for histidine-tagged proteins containing a thrombin cleavage site. *Anal.Biochem.* 295(2), 180-185. 15-8-2001.

Heinz, D. W., Hyberts, S. G., Peng, J. W., Priestle, J. P., Wagner, G., and Grutter, M. G. Changing the inhibitory specificity and function of the proteinase inhibitor eglin c by site-directed mutagenesis: functional and structural investigation. *Biochemistry* 31(37), 8755-8766. 22-9-1992.

Hellwig, V. Generierung neuer Eglin C Varianten und anschließende Analyse der Interaktion mit Trypsin. 2011.

Hess, G. P., McConn, J., Ku, E., and McConkey, G. Studies of the activity of chymotrypsin. *Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.* 257(813), 89-104. 12-2-1970.

Holmes, M. A. and Matthews, B. W. Binding of hydroxamic acid inhibitors to crystalline thermolysin suggests a pentacoordinate zinc intermediate in catalysis. *Biochemistry* 20(24), 6912-6920. 24-11-1981.

Holtz, K. M., Stec, B., and Kantrowitz, E. R. A model of the transition state in the alkaline phosphatase reaction. *J.Biol.Chem.* 274(13), 8351-8354. 26-3-1999.

Huber, R. and Bode, W. Structural Basis of Activation and Action of Trypsin. *Accounts of Chemical Research* 11(3), 114-122. 1978.

- Huber, R., Kukla, D., Bode, W., Schwager, P., Bartels, K., Deisenhofer, J., and Steigemann, W. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 A resolution. *J.Mol.Biol.* 89(1), 73-101. 15-10-1974.
- Hung, S. H. and Hedstrom, L. Converting trypsin to elastase: substitution of the S1 site and adjacent loops reconstitutes esterase specificity but not amidase activity. *Protein Eng* 11(8), 669-673. 1998.
- Imamura, T. and Kitamoto, Y. Expression of enteropeptidase in differentiated enterocytes, goblet cells, and the tumor cells in human duodenum. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol* 285(6), G1235-G1241. 2003.
- Indyk, L. and Fisher, H. F. Theoretical aspects of isothermal titration calorimetry. *Methods Enzymol.* 295, 350-364. 1998.
- Jenny, R. J., Mann, K. G., and Lundblad, R. L. A critical review of the methods for cleavage of fusion proteins with thrombin and factor Xa. *Protein Expr. Purif.* 31(1), 1-11. 2003.
- Jing, H., Babu, Y. S., Moore, D., Kilpatrick, J. M., Liu, X. Y., Volanakis, J. E., and Narayana, S. V. Structures of native and complexed complement factor D: implications of the atypical His57 conformation and self-inhibitory loop in the regulation of specific serine protease activity. *J.Mol.Biol.* 282(5), 1061-1081. 9-10-1998.
- Jing, H., Macon, K. J., Moore, D., DeLucas, L. J., Volanakis, J. E., and Narayana, S. V. Structural basis of profactor D activation: from a highly flexible zymogen to a novel self-inhibited serine protease, complement factor D. *EMBO J.* 18(4), 804-814. 15-2-1999.
- Joe, K., Borgford, T. J., and Bennet, A. J. Generation of a thermostable and denaturant-resistant peptide ligase. *Biochemistry* 43(24), 7672-7677. 22-6-2004.
- Kabsch, W. Automatic Processing of Rotation Diffraction Data from Crystals of Initially Unknown Symmetry and Cell Constants. *Journal of Applied Crystallography* 26, 795-800. 1-12-1993.
- Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr. D.Biol. Crystallogr.* 66(Pt 2), 133-144. 2010a.
- Kabsch, W. XDS. Acta Crystallogr. D.Biol. Crystallogr. 66(Pt 2), 125-132. 2010b.
- Karamloo, F., Scheurer, S., Wangorsch, A., May, S., Haustein, D., and Vieths, S. Pyr c 1, the major allergen from pear (Pyrus communis), is a new member of the Bet v 1 allergen family. *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* 756(1-2), 281-293. 25-5-2001.
- Kendrew, J. C. and Perutz, M. F. X-ray studies of compounds of biological interest. *Annu.Rev.Biochem.* 26, 327-372. 1957.
- Kim, Y. T., Nishii, W., Matsushima, M., Inoue, H., Ito, H., Park, S. J., and Takahashi, K. Substrate specificities of porcine and bovine enteropeptidases toward the peptide Val-(Asp)4-Lys-Ile-Val-Gly and its analogs. *Biosci.Biotechnol.Biochem.* 72(3), 905-908. 2008.
- Kinsella, J. E. Milk proteins: physicochemical and functional properties. *Crit Rev.Food Sci.Nutr.* 21(3), 197-262. 1984.
- Kitamoto, Y., Yuan, X., Wu, Q., McCourt, D. W., and Sadler, J. E. Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91(16), 7588-7592. 2-8-1994.
- Knowles, J. R. Enzyme specificity: alpha-chymotrypsin. J. Theor. Biol. 9(2), 213-228. 1965.

Ko, Y. H., Thomas, P. J., Delannoy, M. R., and Pedersen, P. L. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Overexpression, purification, and characterization of wild type and delta F508 mutant forms of the first nucleotide binding fold in fusion with the maltose-binding protein. *J.Biol.Chem.* 268(32), 24330-24338. 15-11-1993.

Koshland, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 44(2), 98-104. 1958.

Koshland, D. E., Jr. Correlation of structure and function in enzyme action. *Science* 142(3599), 1533-1541. 20-12-1963.

Koshland, D. E., Jr. Das Schlüssel-Schloß-Prinzip und die Induced-fit-Theorie. *Angew. Chem.* 106, 2468-2472. 1994.

Kossiakoff, A. A., Chambers, J. L., Kay, L. M., and Stroud, R. M. Structure of bovine trypsinogen at 1.9 A resolution. *Biochemistry* 16(4), 654-664. 22-2-1977.

Kottwitz, B. and Upadek, H. Einsatz und Nutzen von Enzymen in Waschmitteln. SÖFW-Journal 120(13), 794-800. 1994.

Krieger, M., Kay, L. M., and Stroud, R. M. Structure and specific binding of trypsin: comparison of inhibited derivatives and a model for substrate binding. *J.Mol.Biol.* 83(2), 209-230. 25-2-1974.

Krissinel, E. Crystal contacts as nature's docking solutions. *J. Comput. Chem.* 31(1), 133-143. 15-1-2010.

Krissinel, E. and Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J.Mol.Biol.* 372(3), 774-797. 21-9-2007.

Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., and Otlewski, J. Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cell Mol.Life Sci.* 60(11), 2427-2444. 2003.

Kuhl, P., Elchhorn, U., and Jakubke, H. D. Enzymic peptide synthesis in microaqueous, solvent-free systems. *Biotechnol.Bioeng.* 45(3), 276-278. 5-2-1995.

Kuhl, P. and Jakubke, H. D. [Protease-catalyzed synthesis of peptides in biphasic aqueous-organic systems]. *Pharmazie* 45(6), 393-400. 1990.

Kühn, D., Dürrschmidt, P., Mansfeld, J., and Ulbrich-Hofmann, R. Boilysin and thermolysin in dipeptide synthesis: a comparative study. *Biotechnol.Appl.Biochem.* 36(Pt 1), 71-76. 2002.

Kumaran, S., Datta, D., and Roy, R. P. Conformationally driven protease-catalyzed splicing of peptide segments: V8 protease-mediated synthesis of fragments derived from thermolysin and ribonuclease A. *Protein Sci.* 6(10), 2233-2241. 1997.

Kurth, T., Grahn, S., Thormann, M., Ullmann, D., Hofmann, H. J., Jakubke, H. D., and Hedstrom, L. Engineering the S1' subsite of trypsin: design of a protease which cleaves between dibasic residues. *Biochemistry* 37(33), 11434-11440. 18-8-1998.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259), 680-685. 15-8-1970.

Leong, L. E. The use of recombinant fusion proteases in the affinity purification of recombinant proteins. *Mol.Biotechnol.* 12(3), 269-274. 1999.

Leslie A.G.W. Recent changes to the MOSFLM package for processing film and image plate data. *Joint CCP4 + ESF-EAMCB Newsletter on Protein Crystallography* No. 26. 1992.

- Leung, D., Abbenante, G., and Fairlie, D. P. Protease inhibitors: current status and future prospects. *J.Med.Chem.* 43(3), 305-341. 10-2-2000.
- Liebscher, S. N- und C-terminale Modifizierung von Polypeptiden und Proteinen. 2007.
- Liew, O. W., Ching Chong, J. P., Yandle, T. G., and Brennan, S. O. Preparation of recombinant thioredoxin fused N-terminal proCNP: Analysis of enterokinase cleavage products reveals new enterokinase cleavage sites. *Protein Expr. Purif.* 41(2), 332-340. 2005.
- Light, A. and Fonseca, P. The preparation and properties of the catalytic subunit of bovine enterokinase. *J.Biol.Chem.* 259(21), 13195-13198. 10-11-1984.
- Lin, C. Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q. A., and Dickson, R. B. Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity. *J.Biol.Chem.* 274(26), 18231-18236. 25-6-1999.
- Lombard, C., Saulnier, J., and Wallach, J. M. Recent trends in protease-catalyzed peptide synthesis. *Protein Pept.Lett.* 12(7), 621-629. 2005.
- Lorentsen, R. H., Fynbo, C. H., Thogersen, H. C., Etzerodt, M., and Holtet, T. L. Expression, refolding, and purification of recombinant human granzyme B. *Protein Expr. Purif.* 39(1), 18-26. 2005.
- Lottenberg, R. and Jackson, C. M. Solution composition dependent variation in extinction coefficients for p-nitroaniline. *Biochim.Biophys.Acta* 742(3), 558-564. 15-2-1983.
- Lovell, S. C., Davis, I. W., Arendall, W. B., III, de Bakker, P. I., Word, J. M., Prisant, M. G., Richardson, J. S., and Richardson, D. C. Structure validation by Calpha geometry: phi,psi and Cbeta deviation. *Proteins* 50(3), 437-450. 15-2-2003.
- Lu, D., Fütterer, K., Korolev, S., Zheng, X., Tan, K., Waksman, G., and Sadler, J. E. Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide. *J.Mol.Biol.* 292(2), 361-373. 17-9-1999.
- Lu, D., Yuan, X., Zheng, X., and Sadler, J. E. Bovine proenteropeptidase is activated by trypsin, and the specificity of enteropeptidase depends on the heavy chain. *J.Biol.Chem.* 272(50), 31293-31300. 12-12-1997.
- Madison, E. L., Kobe, A., Gething, M. J., Sambrook, J. F., and Goldsmith, E. J. Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: a regulatory triad of Asp-His-Ser. *Science* 262(5132), 419-421. 15-10-1993.
- Maroux, S., Baratti, J., and Desnuelle, P. Purification and specificity of porcine enterokinase. *J.Biol.Chem.* 246(16), 5031-5039. 25-8-1971.
- McCoy, A. J. Solving structures of protein complexes by molecular replacement with Phaser. *Acta Crystallogr. D.Biol. Crystallogr.* 63(Pt 1), 32-41. 2007.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. Phaser crystallographic software. *J.Appl.Crystallogr.* 40(Pt 4), 658-674. 1-8-2007.
- McGrath, M. E., Erpel, T., Bystroff, C., and Fletterick, R. J. Macromolecular chelation as an improved mechanism of protease inhibition: structure of the ecotin-trypsin complex. *EMBO J.* 13(7), 1502-1507. 1-4-1994.
- McGrath, M. E., Hines, W. M., Sakanari, J. A., Fletterick, R. J., and Craik, C. S. The sequence and reactive site of ecotin. A general inhibitor of pancreatic serine proteases from Escherichia coli. *J.Biol.Chem.* 266(10), 6620-6625. 5-4-1991.

McPherson, A., Jr. Crystallization of proteins from polyethylene glycol. *J.Biol.Chem.* 251(20), 6300-6303. 25-10-1976.

McPherson, A. A comparison of salts for the crystallization of macromolecules. *Protein Sci.* 10(2), 418-422. 2001.

Menzel, A. Flexibilität und Spezifität in Protein-Protein-Wechselwirkungen am Beispiel der Komplexbildung von Trypsin-Varianten und dem Proteaseinhibitor Eglin C. 2009.

Mikhailova, A. G., Likhareva, V. V., Vaskovsky, B. V., Garanin, S. K., Onoprienko, L. V., Prudchenko, I. A., Chikin, L. D., and Rumsh, L. D. Study of secondary specificity of enteropeptidase in comparison with trypsin. *Biochemistry (Mosc.)* 69(8), 909-917. 2004.

Miners, J. S., Barua, N., Kehoe, P. G., Gill, S., and Love, S. Abeta-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *J.Neuropathol.Exp.Neurol.* 70(11), 944-959. 2011.

Müller, A. O., Mrestani-Klaus, C., Schmidt, J., Ulbrich-Hofmann, R., and Dippe, M. New cardiolipin analogs synthesized by phospholipase D-catalyzed transphosphatidylation. *Chem.Phys.Lipids* 165(7), 787-793. 8-10-2012.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53(Pt 3), 240-255. 1-5-1997.

Nallamsetty, S., Kapust, R. B., Tözser, J., Cherry, S., Tropea, J. E., Copeland, T. D., and Waugh, D. S. Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro. *Protein Expr. Purif.* 38(1), 108-115. 2004.

Nanao, M. H. and Ravelli, R. B. Phasing macromolecular structures with UV-induced structural changes. *Structure*. 14(4), 791-800. 2006.

Nanao, M. H., Sheldrick, G. M., and Ravelli, R. B. Improving radiation-damage substructures for RIP. *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* 61(Pt 9), 1227-1237. 2005.

Narayana, S. V., Carson, M., el Kabbani, O., Kilpatrick, J. M., Moore, D., Chen, X., Bugg, C. E., Volanakis, J. E., and DeLucas, L. J. Structure of human factor D. A complement system protein at 2.0 A resolution. *J.Mol.Biol.* 235(2), 695-708. 14-1-1994.

Nesterenko, M. V., Tilley, M., and Upton, S. J. A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J.Biochem.Biophys.Methods* 28(3), 239-242. 1994.

Neurath, H. Proteolytic processing and physiological regulation. *Trends Biochem.Sci.* 14(7), 268-271. 1989.

Otlewski, J., Krowarsch, D., and Apostoluk, W. Protein inhibitors of serine proteinases. *Acta Biochim.Pol.* 46(3), 531-565. 1999.

Otwinowski Z. and Minor W. (1997). Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode. In Methods in Enzymology Volume276: Macromolecular Crystallography, Carter C.W.Jr. and Sweet R.M., eds., pp. 307-326.

Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G., and Gray, T. How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4(11), 2411-2423. 1995.

Page, M. J., Bleackley, M. R., Wong, S., MacGillivray, R. T., and Di Cera, E. Conversion of trypsin into a Na(+)-activated enzyme. *Biochemistry* 45(9), 2987-2993. 7-3-2006.

- Page, M. J., Carrell, C. J., and Di Cera, E. Engineering protein allostery: 1.05 A resolution structure and enzymatic properties of a Na+-activated trypsin. *J.Mol.Biol.* 378(3), 666-672. 2-5-2008.
- Page, M. J. and Di Cera, E. Role of Na+ and K+ in enzyme function. *Physiol Rev.* 86(4), 1049-1092. 2006.
- Page, M. J. and Di Cera, E. Combinatorial enzyme design probes allostery and cooperativity in the trypsin fold. *J.Mol.Biol.* 399(2), 306-319. 4-6-2010.
- Parks, T. D., Leuther, K. K., Howard, E. D., Johnston, S. A., and Dougherty, W. G. Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal.Biochem.* 216(2), 413-417. 1-2-1994.
- Pasternak, A., Ringe, D., and Hedstrom, L. Comparison of anionic and cationic trypsinogens: the anionic activation domain is more flexible in solution and differs in its mode of BPTI binding in the crystal structure. *Protein Sci.* 8(1), 253-258. 1999.
- Pasternak, A., White, A., Jeffery, C. J., Medina, N., Cahoon, M., Ringe, D., and Hedstrom, L. The energetic cost of induced fit catalysis: Crystal structures of trypsinogen mutants with enhanced activity and inhibitor affinity. *Protein Sci.* 10(7), 1331-1342. 2001.
- Pauchon, V., Besson, C., Saulnier, J., and Wallach, J. Peptide synthesis catalysed by Pseudomonas aeruginosa elastase. *Biotechnol.Appl.Biochem.* 17 (Pt 2), 217-221. 1993.
- Pereira, P. J., Bergner, A., Macedo-Ribeiro, S., Huber, R., Matschiner, G., Fritz, H., Sommerhoff, C. P., and Bode, W. Human beta-tryptase is a ring-like tetramer with active sites facing a central pore. *Nature* 392(6673), 306-311. 19-3-1998.
- Perona, J. J. and Craik, C. S. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4(3), 337-360. 1995.
- Perona, J. J., Hedstrom, L., Rutter, W. J., and Fletterick, R. J. Structural origins of substrate discrimination in trypsin and chymotrypsin. *Biochemistry* 34(5), 1489-1499. 7-2-1995.
- Perona, J. J., Hedstrom, L., Wagner, R. L., Rutter, W. J., Craik, C. S., and Fletterick, R. J. Exogenous acetate reconstitutes the enzymatic activity of trypsin Asp189Ser. *Biochemistry* 33(11), 3252-3259. 22-3-1994.
- Perona, J. J., Tsu, C. A., McGrath, M. E., Craik, C. S., and Fletterick, R. J. Relocating a negative charge in the binding pocket of trypsin. *J.Mol.Biol.* 230(3), 934-949. 5-4-1993.
- Peterson, F. C., Gordon, N. C., and Gettins, P. G. High-level bacterial expression and 15N-alanine-labeling of bovine trypsin. Application to the study of trypsin-inhibitor complexes and trypsinogen activation by NMR spectroscopy. *Biochemistry* 40(21), 6275-6283. 29-5-2001.
- Petry, E. (1912). Real-Enzyklopädie der Gesamten Pharmazie., Moeller and Thoms, ed. (Berlin/Wien: Urban und Schwarzenberg: pp. 129-130.
- Pflugrath, J. W. The finer things in X-ray diffraction data collection. *Acta Crystallogr. D.Biol. Crystallogr.* 55(Pt 10), 1718-1725. 1999.
- Pierce, M. M., Raman, C. S., and Nall, B. T. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* 19(2), 213-221. 1999.
- Pineda, A. O., Carrell, C. J., Bush, L. A., Prasad, S., Caccia, S., Chen, Z. W., Mathews, F. S., and Di Cera, E. Molecular dissection of Na+ binding to thrombin. *J.Biol.Chem.* 279(30), 31842-31853. 23-7-2004.

- Pineda, A. O., Chen, Z. W., Bah, A., Garvey, L. C., Mathews, F. S., and Di Cera, E. Crystal structure of thrombin in a self-inhibited conformation. *J.Biol.Chem.* 281(43), 32922-32928. 27-10-2006.
- Pineda, A. O., Savvides, S. N., Waksman, G., and Di Cera, E. Crystal structure of the anticoagulant slow form of thrombin. *J.Biol.Chem.* 277(43), 40177-40180. 25-10-2002.
- Ponder, J. W. and Richards, F. M. Tertiary templates for proteins. Use of packing criteria in the enumeration of allowed sequences for different structural classes. *J.Mol.Biol.* 193(4), 775-791. 20-2-1987.
- Powell, H. R. The Rossmann Fourier autoindexing algorithm in MOSFLM. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 55(Pt 10), 1690-1695. 1999.
- Pritz, S. Enzymatische Ligation von Peptiden, Peptidnucleinsäuren und Proteinen. 2008.
- Pritz, S., Kraetke, O., Klose, A., Klose, J., Rothemund, S., Fechner, K., Bienert, M., and Beyermann, M. Synthesis of protein mimics with nonlinear backbone topology by a combined recombinant, enzymatic, and chemical synthesis strategy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47(19), 3642-3645. 2008.
- Puente, X. S., Sanchez, L. M., Gutierrez-Fernandez, A., Velasco, G., and Lopez-Otin, C. A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems. *Biochem.Soc.Trans.* 33(Pt 2), 331-334. 2005.
- Purbey, P. K., Jayakumar, P. C., Deepalakshmi, P. D., Patole, M. S., and Galande, S. GST fusion vector with caspase-6 cleavage site for removal of fusion tag during column purification. *Biotechniques* 38(3), 360, 362, 364. 2005.
- Radisky, E. S., Lu, C. J., Kwan, G., and Koshland, D. E., Jr. Role of the intramolecular hydrogen bond network in the inhibitory power of chymotrypsin inhibitor 2. *Biochemistry* 44(18), 6823-6830. 10-5-2005.
- Rais-Beghdadi, C., Roggero, M. A., Fasel, N., and Reymond, C. D. Purification of recombinant proteins by chemical removal of the affinity tag. *Appl.Biochem.Biotechnol.* 74(2), 95-103. 1998.
- Rall, K. and Bordusa, F. Substrate mimetics-specific peptide ligases: studies on the synthetic utility of a zymogen and zymogen-like enzymes. *J.Org. Chem.* 67(25), 9103-9106. 13-12-2002.
- Ranby, M., Bergsdorf, N., and Nilsson, T. Enzymatic properties of the one- and two-chain form of tissue plasminogen activator. *Thromb.Res.* 27(2), 175-183. 15-7-1982.
- Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., and Deshpande, V. V. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62(3), 597-635. 1998.
- Rauh, D., Klebe, G., and Stubbs, M. T. Understanding protein-ligand interactions: the price of protein flexibility. *J.Mol.Biol.* 335(5), 1325-1341. 30-1-2004.
- Rauh, D., Klebe, G., Sturzebecher, J., and Stubbs, M. T. ZZ made EZ: influence of inhibitor configuration on enzyme selectivity. *J.Mol.Biol.* 330(4), 761-770. 18-7-2003.
- Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G., and Stubbs, M. T. Trypsin mutants for structure-based drug design: expression, refolding and crystallisation. *Biol. Chem.* 383(7-8), 1309-1314. 2002.
- Ravelli, R. B., Nanao, M. H., Lovering, A., White, S., and McSweeney, S. Phasing in the presence of radiation damage. *J.Synchrotron.Radiat.* 12(Pt 3), 276-284. 2005.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Bateman, A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 38(Database issue), D227-D233. 2010.

- Rawlings, N. D., Barrett, A. J., and Bateman, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 40(Database issue), D343-D350. 2012.
- Read, R. J. Improved Fourier Coefficients for Maps Using Phases from Partial Structures with Errors. *Acta Crystallographica Section A* 42, 140-149. 1-5-1986.
- Read, R. J. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr. D.Biol. Crystallogr.* 57(Pt 10), 1373-1382. 2001.
- Renatus, M., Bode, W., Huber, R., Sturzebecher, J., and Stubbs, M. T. 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(27), 5445-5456. 31-12-1998.
- Renatus, M., Stubbs, M. T., Huber, R., Bringmann, P., Donner, P., Schleuning, W. D., and Bode, W. Catalytic domain structure of vampire bat plasminogen activator: a molecular paradigm for proteolysis without activation cleavage. *Biochemistry* 36(44), 13483-13493. 4-11-1997.
- Renaud, A., Lestienne, P., Hughes, D. L., Bieth, J. G., and Dimicoli, J. L. Mapping of the S' subsites of porcine pancreatic and human leucocyte elastases. *J.Biol.Chem.* 258(13), 8312-8316. 10-7-1983.
- Reyda, S., Sohn, C., Klebe, G., Rall, K., Ullmann, D., Jakubke, H. D., and Stubbs, M. T. Reconstructing the binding site of factor Xa in trypsin reveals ligand-induced structural plasticity. *J.Mol.Biol.* 325(5), 963-977. 31-1-2003.
- Richards, F. M. On the enzymic activity of subtilisin-modified ribonuclease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 44(2), 162-166. 1958.
- Rival, S., Besson, C., Saulnier, J., and Wallach, J. Dipeptide derivative synthesis catalyzed by Pseudomonas aeruginosa elastase. *J.Pept.Res.* 53(2), 170-176. 1999.
- Rose, R. B., Craik, C. S., Douglas, N. L., and Stroud, R. M. Three-dimensional structures of HIV-1 and SIV protease product complexes. *Biochemistry* 35(39), 12933-12944. 1-10-1996.
- Rose, R. B., Craik, C. S., and Stroud, R. M. Domain flexibility in retroviral proteases: structural implications for drug resistant mutations. *Biochemistry* 37(8), 2607-2621. 24-2-1998.
- Rossmann, M. G. Molecular replacement--historical background. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57(Pt 10), 1360-1366. 2001.
- Rossmann, M. G. and Blow, D. M. Detection of Sub-Units Within Crystallographic Asymmetric Unit. *Acta Crystallographica* 15(JAN10), 24-&. 1962.
- Rothman, S. S. The digestive enzymes of the pancreas: a mixture of inconstant proportions. *Annu.Rev.Physiol* 39, 373-389. 1977.
- Rudolph,R., Böhm,G., Lilie,H., and Jaenicke,R. (1997). Folding proteins. In Protein Function, a Practical Approach, (Oxford: IRL-Press, Oxford University Press), pp. 57-99.
- Rudolph, R. and Lilie, H. In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB J. 10(1), 49-56. 1996.
- Rühlmann, A., Kukla, D., Schwager, P., Bartels, K., and Huber, R. Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. Crystal structure determination and stereochemistry of the contact region. *J.Mol.Biol.* 77(3), 417-436. 5-7-1973.
- Rupp, B. (2010). Biomolecular Crystallography. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

Santarsiero, B. D., Yegian, D. T., Lee, C. C., Spraggon, G., Gu, J., Scheibe, D., Uber, D. C., Cornell, E. W., Nordmeyer, R. A., Kolbe, W. F., Jin, J., Jones, A. L., Jaklevic, J. M., Schultz, P. G., and Stevens, R. C. An approach to rapid protein crystallization using nanodroplets. *Journal of Applied Crystallography* 35, 278-281. 2002.

Schägger, H. and von Jagow, G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal.Biochem.* 166(2), 368-379. 1-11-1987.

Schechter, I. and Berger, A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 27(2), 157-162. 20-4-1967.

Schellenberger, V., Braune, K., Hofmann, H. J., and Jakubke, H. D. The specificity of chymotrypsin. A statistical analysis of hydrolysis data. *Eur.J.Biochem.* 199(3), 623-636. 1-8-1991.

Schellenberger, V., Turck, C. W., and Rutter, W. J. Role of the S' subsites in serine protease catalysis. Active-site mapping of rat chymotrypsin, rat trypsin, alpha-lytic protease, and cercarial protease from Schistosoma mansoni. *Biochemistry* 33(14), 4251-4257. 12-4-1994.

Schiltz, M., Shepard, W., Fourme, R., Prange, T., de La, Fortelle E., and Bricogne, G. High-pressure krypton gas and statistical heavy-atom refinement: a successful combination of tools for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 53(Pt 1), 78-92. 1-1-1997.

Schmitt, M., Harbeck, N., Brünner, N., Jänicke, F., Meisner, C., Mühlenweg, B., Jansen, H., Dorn, J., Nitz, U., Kantelhardt, E. J., and Thomssen, C. Cancer therapy trials employing level-of-evidence-1 disease forecast cancer biomarkers uPA and its inhibitor PAI-1. *Expert.Rev.Mol.Diagn.* 11(6), 617-634. 2011.

Schönfeld, D. L., Ravelli, R. B., Mueller, U., and Skerra, A. The 1.8-A crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomucoid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *J.Mol.Biol.* 384(2), 393-405. 12-12-2008.

Schöpfel, M., Tziridis, A., Arnold, U., and Stubbs, M. T. Towards a restriction proteinase: construction of a self-activating enzyme. *Chembiochem.* 12(10), 1523-1527. 4-7-2011.

Seemüller, U., Eulitz, M., Fritz, H., and Strobl, A. Structure of the elastase-cathepsin G inhibitor of the leech Hirudo medicinalis. *Hoppe Seylers Z.Physiol Chem.* 361(12), 1841-1846. 1980.

Seemüller, U., Meier, M., Ohlsson, K., Müller, H. P., and Fritz, H. 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(9), 1105-1107. 1977.

Sela, B. A. and Doolman, R. [proPSA: a precursor of prostate-specific antigen, may improve the early diagnosis of prostate cancer]. *Harefuah* 150(5), 466-9, 489. 2011.

Sewald N. and Jakubke H.D. (2002). Peptides: Chemistry and Biology. WILEY-VCH, ed. Weinheim: pp. 247-267.

Sharkhuukhen, A. Studien zur Zink-induzierten Histidinspezifität ausgewählter Proteasen. 2009.

Sharma, S. and Rose, D. R. Cloning, overexpression, purification, and characterization of the carboxyl-terminal nucleotide binding domain of P-glycoprotein. *J.Biol.Chem.* 270(23), 14085-14093. 9-6-1995.

Shaw, W. V. Protein engineering. The design, synthesis and characterization of factitious proteins. *Biochem.J.* 246(1), 1-17. 15-8-1987.

- Shiozaki, E. N., Chai, J., Rigotti, D. J., Riedl, S. J., Li, P., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Fairman, R., and Shi, Y. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9. *Mol.Cell* 11(2), 519-527. 2003.
- Shotton, D. M. and Hartley, B. S. Amino-acid sequence of porcine pancreatic elastase and its homologies with other serine proteinases. *Nature* 225(5235), 802-806. 28-2-1970.
- Shotton, D. M. and Watson, H. C. Three-dimensional structure of tosyl-elastase. *Nature* 225(5235), 811-816. 28-2-1970.
- Sichler, K., Hopfner, K. P., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W., and Brandstetter, H. The influence of residue 190 in the S1 site of trypsin-like serine proteases on substrate selectivity is universally conserved. *FEBS Lett.* 530(1-3), 220-224. 23-10-2002.
- Soman, K., Yang, A. S., Honig, B., and Fletterick, R. Electrical potentials in trypsin isozymes. *Biochemistry* 28(26), 9918-9926. 26-12-1989.
- Sriram, P., Kalogerakis, N., and Behie, L. A. Experimental determination of the rate of autolysis of trypsin at 37 degrees C. *Biotechnology Techniques* 10(8), 601-606. 1996.
- Stein, R. L., Strimpler, A. M., Hori, H., and Powers, J. C. Catalysis by human leukocyte elastase: mechanistic insights into specificity requirements. *Biochemistry* 26(5), 1301-1305. 10-3-1987.
- Stemmer, W. and Holland, B. Survival of the fittest molecule. *American Scientist* 91(6), 526-533. 2003.
- Sterner, R. Directed evolution: a powerful approach to optimising and understanding enzymes. *Chembiochem.* 12(10), 1439-1440. 4-7-2011.
- Stubbs, M. T., Huber, R., and Bode, W. 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(1-2), 103-107. 13-11-1995.
- Stubbs, M. T., Renatus, M., and Bode, W. An active zymogen: unravelling the mystery of tissue-type plasminogen activator. *Biol. Chem.* 379(2), 95-103, 1998.
- Stubbs, M. T., Reyda, S., Dullweber, F., Möller, M., Klebe, G., Dorsch, D., Mederski, W. W., and Wurziger, H. pH-dependent binding modes observed in trypsin crystals: lessons for structure-based drug design. *Chembiochem.* 3(2-3), 246-249. 1-3-2002.
- Sun, P. D. and Radaev, S. Generating isomorphous heavy-atom derivatives by a quick-soak method. Part II: phasing of new structures. *Acta Crystallogr.D Biol. Crystallogr.* 58(Pt 7), 1099-1103. 2002.
- Sun, P. D., Radaev, S., and Kattah, M. Generating isomorphous heavy-atom derivatives by a quick-soak method. Part I: test cases. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 58(Pt 7), 1092-1098. 2002.
- Sutton, R. L. Critical cooling rates for aqueous cryoprotectants in the presence of sugars and polysaccharides. *Cryobiology* 29(5), 585-598. 1992.
- Svedberg, T. Molecular weight analysis in centrifugal fields. Science 79(2050), 327-332. 13-4-1934.
- Szabo, E., Bocskei, Z., Naray-Szabo, G., and Graf, L. The three-dimensional structure of Asp189Ser trypsin provides evidence for an inherent structural plasticity of the protease. *Eur.J.Biochem.* 263(1), 20-26. 1999.
- Takano, S. Tumor markers for diencephalon and pituitary diseases: urinary matrix metalloproteinases. *Nihon Rinsho* 69 Suppl 2, 155-159. 2011.

Tao, Y., Strelkov, S. V., Mesyanzhinov, V. V., and Rossmann, M. G. Structure of bacteriophage T4 fibritin: a segmented coiled coil and the role of the C-terminal domain. *Structure*. 5(6), 789-798. 15-6-1997.

Tate, K. M., Higgins, D. L., Holmes, W. E., Winkler, M. E., Heyneker, H. L., and Vehar, G. A. Functional role of proteolytic cleavage at arginine-275 of human tissue plasminogen activator as assessed by site-directed mutagenesis. *Biochemistry* 26(2), 338-343. 27-1-1987.

Timasheff, S. N. On the mechanism of alpha-chymotrypsin dimerization. *Arch.Biochem.Biophys.* 132(1), 165-169. 1969.

Tolman, R. C. The Principle of Microscopic Reversibility. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 11(7), 436-439. 1925.

Tziridis, A. Dissertation: Untersuchungen zum Verständnis von Substrat-Liganden-Affinität mit Hilfe von Proteinase Engineering. 2008.

Ursel, C. Optimierung der in vitro Renaturierung von Easter und Spätzle Processing Enzyme zur biophysikalischen Charakterisierung. 2009.

van den Berg, S., Lofdahl, P. A., Hard, T., and Berglund, H. Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *J.Biotechnol.* 121(3), 291-298. 10-2-2006.

Van't Hoff J.H. Z. Anorg. Chem. 18, 1-13. 1898.

Vincent, J. P. and Lazdunski, M. Trypsin-pancreatic trypsin inhibitor association. Dynamics of the interaction and role of disulfide bridges. *Biochemistry* 11(16), 2967-2977. 1-8-1972.

Vogt, A. D., Bah, A., and Di Cera, E. Evidence of the E*-E equilibrium from rapid kinetics of Na+binding to activated protein C and factor Xa. *J.Phys. Chem. B* 114(49), 16125-16130. 16-12-2010.

Volkmann, G. and Mootz, H. D. Recent progress in intein research: from mechanism to directed evolution and applications. *Cell Mol.Life Sci.* 28-8-2012.

Vozza, L. A., Wittwer, L., Higgins, D. R., Purcell, T. J., Bergseid, M., Collins-Racie, L. A., LaVallie, E. R., and Hoeffler, J. P. Production of a recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. *Biotechnology (N.Y.)* 14(1), 77-81. 1996.

Wade, R. D., Hass, G. M., Kumar, S., Walsh, K. A., and Neurath, H. The amino acid sequence of the activation peptide of bovine pro-carboxypeptidase A. *Biochimie* 70(9), 1137-1142. 1988.

Wallace, A. C., Laskowski, R. A., and Thornton, J. M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng* 8(2), 127-134. 1995.

Walsh, M. A., Evans, G., Sanishvili, R., Dementieva, I., and Joachimiak, A. MAD data collection - current trends. *Acta Crystallogr.D Biol. Crystallogr.* 55(Pt 10), 1726-1732. 1999.

Walter, J., Steigemann, W., Singh, T. P., Bartunik, H., Bode, W., and Huber, R. On the Disordered Activation Domain in Trypsinogen - Chemical Labeling and Low-Temperature Crystallography. *Acta Crystallographica Section B-Structural Science* 38(MAY), 1462-1472. 1982.

Wang, C., Castro, A. F., Wilkes, D. M., and Altenberg, G. A. Expression and purification of the first nucleotide-binding domain and linker region of human multidrug resistance gene product: comparison of fusions to glutathione S-transferase, thioredoxin and maltose-binding protein. *Biochem.J.* 338 (Pt 1), 77-81. 15-2-1999.

Wang, D., Bode, W., and Huber, R. Bovine chymotrypsinogen A X-ray crystal structure analysis and refinement of a new crystal form at 1.8 A resolution. *J.Mol.Biol.* 185(3), 595-624. 5-10-1985.

Watkins, R. W., Arnold, U., and Raines, R. T. Ribonuclease S redux. *Chem. Commun. (Camb.)* 47(3), 973-975. 21-1-2011.

Wehofsky, N., Wespe, C., Cerovsky, V., Pech, A., Hoess, E., Rudolph, R., and Bordusa, F. Ionic liquids and proteases: a clean alliance for semisynthesis. *Chembiochem.* 9(9), 1493-1499. 16-6-2008.

Willett, W. S., Brinen, L. S., Fletterick, R. J., and Craik, C. S. Delocalizing trypsin specificity with metal activation. *Biochemistry* 35(19), 5992-5998. 14-5-1996.

Willett, W. S., Gillmor, S. A., Perona, J. J., Fletterick, R. J., and Craik, C. S. Engineered metal regulation of trypsin specificity. *Biochemistry* 34(7), 2172-2180. 21-2-1995.

Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal.Biochem.* 179(1), 131-137. 15-5-1989.

Wlodawer, A., Svensson, L. A., Sjolin, L., and Gilliland, G. L. Structure of phosphate-free ribonuclease A refined at 1.26 A. *Biochemistry* 27(8), 2705-2717. 19-4-1988.

Xu, S., Rall, K., and Bordusa, F. Enzymatic coupling of specific peptides at nonspecific ligation sites: effect of Asp189Glu mutation in trypsin on substrate mimetic-mediated reactions. *J.Org.Chem.* 66(5), 1627-1632. 9-3-2001.

Yamashina, I. The action of enterokinase on trypsinogen. *Biochim.Biophys.Acta* 20(2), 433-434. 1956.

Yang, S. Q., Wang, C. I., Gillmor, S. A., Fletterick, R. J., and Craik, C. S. Ecotin: a serine protease inhibitor with two distinct and interacting binding sites. *J.Mol.Biol.* 279(4), 945-957. 19-6-1998.

Zakharova, E., Horvath, M. P., and Goldenberg, D. P. Structure of a serine protease poised to resynthesize a peptide bond. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 106(27), 11034-11039. 7-7-2009.

Zamolodchikova, T. S., Sokolova, E. A., Lu, D., and Sadler, J. E. Activation of recombinant proenteropeptidase by duodenase. *FEBS Lett.* 466(2-3), 295-299. 28-1-2000.

Anhang

A.1 Alignment der Sequenzen der in dieser Dissertation bearbeiteten Serinproteasen und der Vergleich zu Chymotrypsin A aus dem Rind:

Kationisches_Rindertrypsin -----IVGGYTCGANTVPYQVSLN--SGYHFCGGSLINSQWVVSAAHC- 41
Kationisches_Rindertrypsinogen VDDDDKIVGGYTCGANTVPYQVSLN--SGYHFCGGSLINSQWVVSAAHC- 47
Anionisches_Rattentrypsin -----IVGGYTCQENSVPYQVSLN--SGYHFCGGSLINDQWVVSAAHC- 41
Rinderchymotrypsin_A -----IVNGEEAVPGSWPWQVSLQDKTGFHFCGGSLINENWVVTAAHCG 44
Leichte_Kette_Enteropeptidase -----IVGGSDSREGAWPWVALY-FDDQQVCGASLVSRWUVSAAHCV 43 ----IVGGYTCGANTVPYOVSLN--SGYHFCGGSLINSOWVVSAAHC- 41 Kationisches Rindertrypsin **.* . .: *: *:* . :.**.**:. :*:*:** Kationisches_Rindertrypsin YKSGIQ-----VRLGEDNI-NVVEGNEQFISASKSIVHPSYNSNTLNNDI 85
Kationisches_Rindertrypsinogen YKSGIQ-----VRLGEDNI-NVVEGNEQFISASKSIVHPSYNSNTLNNDI 91
Anionisches_Rattentrypsin YKSRIQ-----VRLGEHNI-NVLEGNEQFVNAAKIIKHPNFDRKTLNNDI 85
Rinderchymotrypsin_A VTTSDV-----VVAGEFDQ-GSSSEKIQKLKIAKVFKNSKYNSLTINNDI 88
Leichte_Kette_Enteropeptidase YGRNMEPSKWKAVLGLHMASNLTSPQIETRLIDQIVINPHYNKRRKNNDI 93 Kationisches Rindertrypsin YKSGIQ----VRLGEDNI-NVVEGNEQFISASKSIVHPSYNSNTLNNDI 85 . . : : : . :. :: Kationisches_Rindertrypsin MLIKLKSAASLNSRVASISLPTSCA--SAGTQCLISGWGNTKSSGTSYPD 133
Kationisches_Rindertrypsinogen MLIKLKSAASLNSRVASISLPTSCA--SAGTQCLISGWGNTKSSGTSYPD 139
Anionisches_Rattentrypsin MLIKLSSPVKLNARVATVALPSSCA--PAGTQCLISGWGNTLSSGVNEPD 133
Rinderchymotrypsin_A TLLKLSTAASFSQTVSAVCLPSASDDFAAGTTCVTTGWGLTRYTNANTPD 138 KINGERCHYMOTRYPSIN_A
LEICHTE_KETTE_Enteropeptidase
LEICHTE_KETTE_Enteropeptidase
LEICHTE_KETTE_Enteropeptidase
LEICHTE_KETTE_Enteropeptidase
LEICHTE_KETTE_ENTEROPEPTIDE
LEICHTE_KETTE_ENTEROPEPTIDE
LEICHTE_KETTE_ENTEROPEPTIDE
LEICHTE_KETTE_ENTEROPEPTIDE
LEICHTE_KETTE_LEICHTE
LEICHTE_LEICHTE
LEICHTE
LEICHTE_LEICHTE
LEICHTE_LEICHTE
LEICHTE
LEICHTE
LEICHTE
LEICHTE
LEICHTE
LEICHTE
L Adlionisches_Rindertrypsin VLKCLKAPILSDSSCKSAYPG-QITSNMFCAGYLEGGKDSCQGDSGGPVV 182
Kationisches_Rindertrypsin VLKCLKAPILSDSSCKSAYPG-QITSNMFCAGYLEGGKDSCQGDSGGPVV 188
Anionisches_Rattentrypsin LQCLDAPLLPQADCEASYPG-KITDNMVCVGFLEGGKDSCQCDSGGPVV 188
RINONASIDITONING *: . *:*.: .*: :*.. *.*.* Racionisches_Rindertrypsin
Kationisches_Rindertrypsinogen
Anionisches_Rattentrypsin
Anionisches_Rattentrypsin
CNG---ELQGIVSWGSGCAQKNKPGVYTKVCNYVSWIKQTIASN 223
CNG---ELQGIVSWGYGCALPDNPGVYTKVCNYVDWIQDTIAAN 223
CKKNGAWTLVGIVSWGSSTCSTSTDGVVADVWADVWALVDWICCI Leichte_Kette_Enteropeptidase CKKNGAWILVGIVSWGSSTCSISIFGVYARVTALVNWVQQILAAN 230

Leichte_Kette_Enteropeptidase CQENNRWLLAGVTSGQQCALPNRPGVYARVPRFTEWIQGFLH-- 235

* *:.*:* . . ****::* ..*::.:

A.2 Liste der für die Kristallisation verwendeten Screening-Kits verschiedener Firmen:

Firma	Screening-Kit
Hampton Research	Crystal Screen™ HR2-110,
	Crystal Screen 2™ HR2-112
Molecular Dimension	<i>Morpheus</i> TM <i>MD 1 - 46 / MD 1 - 47</i>
Sigma-Aldrich	Basic Kit, Cryo Kit, Extension Kit, Low Ionic
	Strength Kit
Jena Bioscience	JBScreen Classic 1 - 10,
	JBScreen JCSG++ 1 - 4

A.3 Liste der Raumgruppen und Zellparameter für die in der Dissertation erhaltenen Kristallformen von Trypsiligase:

Kristallform	Kristallart	Raumgruppe	Zellparameter
Kristallform I (b-Trypsiligase)	trigonal	P3 ₁ 21	a = 54,51; b = 54,51; c = 107,08 $\alpha = \beta = 90^{\circ}; \gamma = 120^{\circ}$
Kristallform II (b-Trypsiligase)	orthorhombisch	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	a = 44,67; b = 54,09; c = 97,33 $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$
Kristallform III (b-Trypsiligase)	orthorhombisch	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	a = 54.5; b = 58.6; c = 66.8 $\alpha = \beta = \gamma = 90^{\circ}$
Kristallform IV (r-Trypsiligase)	monoklin	C2	a = 143,33; b = 42,71; c = 99,67 $\alpha = 90^{\circ}; \beta = 130,82^{\circ}; \gamma = 90^{\circ}$
Kristallform V (Komplex aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin)	monoklin	P2 ₁	a = 94,24; b = 78,62; c = 98,08 $\alpha = 90^{\circ}; \beta = 96,62^{\circ}; \gamma = 90^{\circ}$

A.4 Tabelle: Datensammlung und Statistik des Refinements für b-Trypsiligase

Kristallform I

Datensammlung			
Beamline	BESSY BL	14.2	
Wellenlänge (Å)	$\lambda = 0.918$		
Raumgruppe	P3 ₁ 21		
Zelldimensionen (Å)	a = 54,51	$\alpha = 90^{\circ}$	
	b = 54,51	$\beta = 90^{\circ}$	
	c = 107,08	$\gamma = 120^{\circ}$	
Max. Auflösung (Å)	1.00		
R_{merge}^{a}	5,1	(42,0)	
Vollständigkeit (%)	88,6	(55,8)	
Anzahl der Reflexe	612208		
Anzahl der Einzelreflexe	88765		
$<$ I $/\sigma$ (I $)>$	21,08	(2,7)	
Refinement			
Auflösungsbereich (Å)	19,69-1,00	(1,0114-1,0000)	
Vollständigkeit (working + test) (%)	88.6		
Anzahl der Reflexe (F>0)	88756	(4439)	
Wilson B (Å ²)	11,082		
R_{cryst}^{b} (%)	15,00		
R_{free}^{c} (%)	17,30		
Anzahl von Nicht-Wasserstoff-Atomen	1723		
Protein	1531		
Wasser	185		
Ca ²⁺ , Glycerol	7		
Mittlerer-B-Faktor (\mathring{A}^2)			
Protein	9,94		
Wasser	19,66		
Ca ²⁺ , Glycerol	15,25		
^a $R_{merge} = \sum I - \langle I \rangle / \langle I \rangle$			

 $R_{merge} = \sum | I - \langle I \rangle | / \langle I \rangle$

 $^{^{\}rm b}$ R_{cryst} = \sum || ${\rm F_{obs}}$ | - | ${\rm F_{calc}}$ || / | ${\rm F_{obs}}$ | für alle Reflexe.

 $^{{}^{}c}R_{free}$ berechnet aus R_{cryst} für ein Testset, der 5% der Reflexe enthält, die nicht für das Refinement genutzt wurden Zahlenwerte in Klammern stellen die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale dar.

A.5 Tabelle: Datensammlung und Statistik des Refinements für b-Trypsiligase

Kristallform III

Datensammlung		
Beamline	BESSY BL 14.1	
Wellenlänge (Å)	$\lambda = 0.918$	
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Zelldimensionen (Å)	a = 54,522	$\alpha = 90^{\circ}$
	b = 58,607	$\beta = 90^{\circ}$
	c = 66,831	$\gamma = 90^{\circ}$
Max. Auflösung (Å)	1,31	
R_{merge}^{a}	6,0	(16,6)
Vollständigkeit (%)	98,1	(96,5)
Anzahl der Reflexe	377469	
Anzahl der Einzelreflexe	51246	
<i σ(i)=""></i>	23,17	(10,81)
Refinement		
Auflösungsbereich (Å)	44,06-1,31	(1,3346-1,3094)
Vollständigkeit (working + test) (%)	98,18	
Anzahl der Reflexe (F>0)	48683	
Wilson B (Å ²)	12,404	
R_{cryst}^{b} (%)	12,80	
$R_{free}^{\ \ c}$ (%)	15,50	
Anzahl von Nicht-Wasserstoff-Atomen	1968	
Protein	1705	
Wasser	256	
Ca ²⁺ , Glycerol	7	
Mittlerer-B-Faktor (\mathring{A}^2)		
Protein	11,31	
Wasser	24,58	
Ca ²⁺ , Glycerol	18,88	
^a $R_{merge} = \sum I - \langle I \rangle / \langle I \rangle$		

 $R_{merge} = \sum | I - \langle I \rangle | / \langle I \rangle$

 $^{^{}b}~R_{cryst} = \sum \left\| \left. F_{obs} \right| - \left| \left. F_{calc} \right| \right| / \left| \left. F_{obs} \right| \right| ~für~alle~Reflexe.$

 $^{{}^{}c}R_{free}$ berechnet aus R_{cryst} für ein Testset, der 5% der Reflexe enthält, die nicht für das Refinement genutzt wurden Zahlenwerte in Klammern stellen die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale dar.

A.6 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen b-Trypsiligase (Kristallform III) zu seinen symmetrieverwandten Molekül (Koordinaten: $x - ^1/_2$; -y - $^1/_2$, -z):

	b-Trypsiligase- Molekül	Abstand (Å)	symmetrieverwandtes Molekül $(x^{-1}/_2; -y^{-1}/_2, -z)$
1	A:ASN 72[ND2]	3.15	A:TYR 59[OH]
2	A:SER 150[OG]	2.76	A:SER 86[O]
3	A:ASN 74[ND2]	2.92	A:SER 88[O]
4	A:ARG 66[NH2]	2.87	A:PRO 92[O]
5	A:TYR 39[OH]	3.22	A:SER 244[O]
6	A:GLY 38[O]	2.86	A:TRP 237[NE1]
7	A:ASN 74[OD1]	2.94	A:VAL 90[N]
8	A:GLY 148[O]	3.52	A:LYS 107[NZ]
9	A:ASP 153[OD2]	2.60	A:TYR 59[OH]

A.7 Tabelle: Datensammlung und Statistik des Refinements für b-Trypsiligase

Kristallform III nach dem Zn²⁺-soak

Datensammlung					
Beamline BESSY BL 14.1					
Wellenlänge (Å)	$\lambda = 0.918$				
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁				
Zelldimensionen (Å)	a = 54,404	$\alpha = 90^{\circ}$			
	b = 58,55	$\beta = 90^{\circ}$			
	c = 67,316	$\gamma = 90^{\circ}$			
Max. Auflösung (Å)	1.31				
R_{merge}^{a}	4,6	(25,2)			
Vollständigkeit (%)	96,6	(82,3)			
Anzahl der Reflexe	360464				
Anzahl der Einzelreflexe	51902				
<i σ(i)=""></i>	25,2	(5,55)			
Refinement					
Auflösungsbereich (Å)	44,18-1,30	(1,3225-1,2989)			
Vollständigkeit (working + test) (%)	96,64				
Anzahl der Reflexe (F>0)	49305				
Wilson B (Å ²)	12,847				
$R_{cryst}^{}$ (%)	13,00				
$R_{free}^{c}(\%)$	15,70				
Anzahl von Nicht-Wasserstoff-Atomen	1958				
Protein	1681				
Wasser	269				
Ca ²⁺ , Glycerol	7				
Zn^{2^+}	1				
Mittlerer-B-Faktor (A^2)					
Protein	11,51				
Wasser	24,90				
Ca ²⁺ ,Glycerol	20,45				
Zn^{2+}	8,36				
${}^{a}R_{merge} = \sum I-\langle I \rangle /\langle I \rangle$					

 $^{^{}b}~R_{cryst} = \sum \left\| \left\| \mathbf{F}_{obs} \right\| - \left\| \left\| \mathbf{F}_{obs} \right\| \right\| \right\| \mathbf{F}_{obs} = \mathbf{F}_{obs}$ für alle Reflexe.

 $^{{}^{}c}R_{free}$ berechnet aus R_{cryst} für ein Testset, der 5% der Reflexe enthält, die nicht für das Refinement genutzt wurden Zahlenwerte in Klammern stellen die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale dar.

A.8 Tabelle: Datensammlung und Statistik des Refinements für r-Trypsiligase

Kristallform IV

Datensammlung	
Beamline	BESSY BL 14.1
Wellenlänge (Å)	$\lambda = 0.918$
Raumgruppe	C2
Zelldimensionen (Å)	$a = 143,328$ $\alpha = 90^{\circ}$
	$b = 42,712$ $\beta = 130,82^{\circ}$
	$c = 99,668$ $\gamma = 90^{\circ}$
Max. Auflösung (Å)	2,3
R_{merge}^{a}	11,2 (34,9)
Vollständigkeit (%)	96,3 (81,1)
Anzahl der Reflexe	71447
Anzahl der Einzelreflexe	38472
<i σ(i)=""></i>	7.2 (1,98)
Refinement	
Auflösungsbereich (Å)	19,771-2,3 (2,362-2,3)
Vollständigkeit (working + test) (%)	96,84
Anzahl der Reflexe (F>0)	38431
Wilson B (Å ²)	23,53
R_{cryst}^{b} (%)	21,14
R_{free}^{c} (%)	25,74
Anzahl von Nicht-Wasserstoff-Atomen	3378
Protein	3243
Wasser	134
Zn^{2+}	1
Mittlerer-B-Faktor (\mathring{A}^2)	
Protein	28,589
Wasser	28,235
Zn^{2+}	37,39
^a $R_{merge} = \sum I - \langle I \rangle / \langle I \rangle$	

 $^{^{}b}R_{cryst} = \sum \|F_{obs}\| - \|F_{calc}\| / \|F_{obs}\|$ für alle Reflexe.

 $^{{}^{}c}R_{free}$ berechnet aus R_{cryst} für ein Testset, der 5% der Reflexe enthält, die nicht für das Refinement genutzt wurden Zahlenwerte in Klammern stellen die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale dar.

A.9 Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Monomeren (Kette A und Kette B) von r-Trypsiligase (Kristallform IV):

	r-Try Kette	-	gase	Abstand (Å)	r-Try Kette	-	gase
1 2 3 4	A:GLN A:GLN A:HIS A:PHE	192 [40 [NE2]	3.18 2.45 3.54 2.84	B:LEU B:SER B:SER B:SER	146 [147 [0]
5 6 7	A:HIS A:HIS A:LYS	40 [151 [ND1]	2.04 2.97 2.93 3.30	B:SER B:VAL B:SER	147 [149 [OG]
8 9 10	A:HIS A:GLY A:LEU	143 [219 [-	2.67 2.67 3.07	B:GLN B:GLY B:GLN	192 [216 [OE1] O]
11 12 13	A:SER A:SER A:SER	146[147[0]	2.53 3.62 2.96		192 [40 [41 [NE2]
14 15 16	A:SER A:VAL A:SER	149[171[O] O]	3.15 2.89 3.27	B:HIS B:HIS B:LYS	40 [151 [175 [ND1] NE2] NZ]
17 18	A:GLN A:GLY	_	OE1] O]	2.85 2.79	B:HIS B:GLY	143 [219 [ND1] N]

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Monomeren (Kette B und Kette A) der Struktur von D189S-Trypsin (PDB-Code: 1AMH, Szabo *et al.*, 1999):

	D189S	-Tryp	sin		Abstand	D189	S-Tryp	sin	1
	Kette	В			(Å)	Kett	a A		
1	B:SER	147[OG]	3.53	A:HIS	57[0]
2	B:GLN	192[NE2]	2.79	A:LEU	145[0]
3	B:TYR	39[ОН]	3.83	A:SEF	147[0]
4	B:GLN	192[NE2]	2.95	A:GLY	148[0]
5	B:LYS	175[NΖ]	3.19	A:TYF	217[ОН]
6	B:HIS	57[0]	3.59	A:SEF	147[OG]
7	B:LEU	145[0]	2.69	A:GLN	192[NE.	2]
8	B:SER	147[0]	3.63	A:TYF	39[ОН]
9	B:GLY	148[0]	2.88	A:GLN	192[NE.	2]
10	B:GLN	192[OE1]	3.22	A:ALA	221[N]
11	B:TYR	217[ОН]	3.15	A:LYS	175[NZ]

A.10 Tabellen der Abstände und Winkel zwischen dem Zn²⁺-Ion und seinen Interaktionspartnern in der Kristallform IV von r-Trypsiligase:

A.10 Tabelle 1: Abstände vom Zn²⁺-Ion zu den Histidinen in r-Trypsiligase.

Interaktionspartner des Zn ²⁺ -Ions	Abstand zum Zn ²⁺ -Ion in Å
Nε2-Atom von His143 in Kette A	2,27
Nε2-Atom von His151 in Kette A	2,10
Nε2-Atom von His143 in Kette B	2,19
Nε2-Atom von His151 in Kette B	2,18

A.10 Tabelle 2: Abstände vom ${\rm Zn}^{2^+}$ -Ion zu den Histidinen in r-Trypsiligase.

Winkel einschließende Atome der Interaktion	Bindungswinkel in °
Nε2-His143 (Kette A) Zn ²⁺ Nε2-His151 (Kette A)	112,8
Nε2-His143 (Kette A) Zn ²⁺ Nε2-His143 (Kette B)	101,0
Nε2-His151 (Kette A) Zn ²⁺ Nε2-His151 (Kette B)	101,5
Nε2-His143 (Kette B) Zn ²⁺ Nε2-His151 (Kette B)	112,1

A.11 Tabelle: Datensammlung und Statistik des *Refinements* für den Komplex aus b-Trypsiligase und YRH-Ecotin Kristallform V

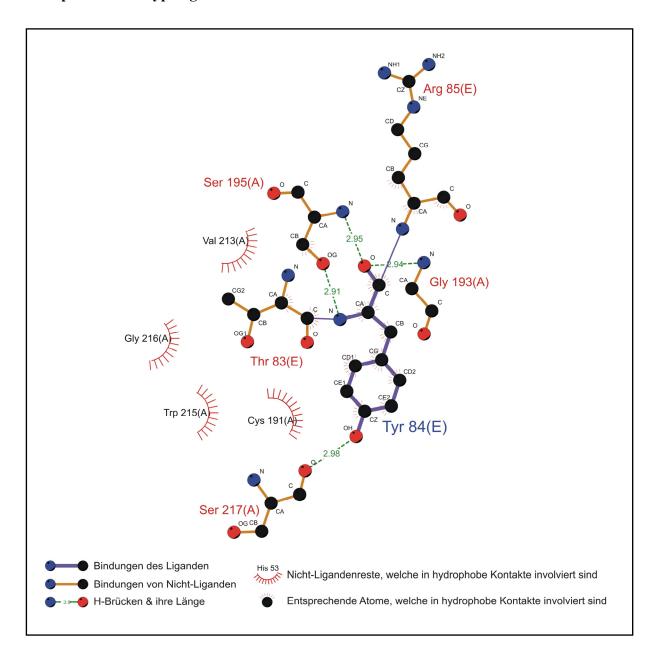
Datensammlung Beamline BESSY BL 14.1 $\lambda = 0.918$ Wellenlänge (Å) Raumgruppe $P2_1$ Zelldimensionen (Å) a = 94,241 $\alpha = 90^{\circ}$ b = 78,615 $\beta = 96,62^{\circ}$ $\gamma = 90^{\circ}$ c = 98,084Max. Auflösung (Å) 2,84 R_{merge}^{a} 11,3 (69,2)Vollständigkeit (%) 99,6 (98,8)Anzahl der Reflexe 128372 Anzahl der Einzelreflexe 33639 $\langle I/\sigma(I)\rangle$ 10,73 (1,96)Refinement Auflösungsbereich (Å) 49,60-2,84 (2,9272-2,8436)Vollständigkeit (working + test) (%) 99,59 Anzahl der Reflexe (F>0) 33622 Wilson B ($Å^2$) 49,68 R_{cryst}^{b} (%) 19,17 R_{free}^{c} (%) 25,20 Anzahl von Nicht-Wasserstoff-Atomen 10574 Protein 10536 Wasser 33 Ca^{2+} 4 Zn^{2+} 1 Mittlerer-B-Faktor (\mathring{A}^2) Protein 26,79 Wasser 12,12 Ca^{2+} 38,27 Zn^{2+} 81,22

^a $R_{merge} = \sum | I - \langle I \rangle | / \langle I \rangle$

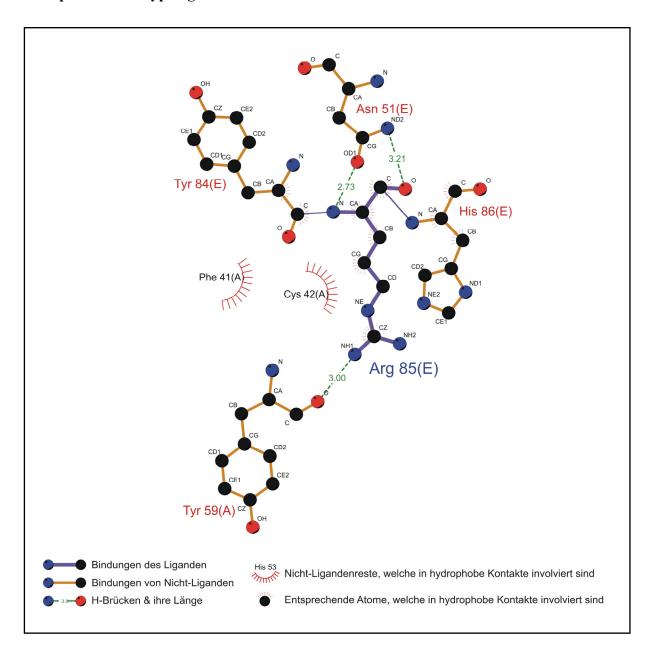
 $^{^{}b}R_{cryst} = \sum \|F_{obs}\| - \|F_{calc}\| / \|F_{obs}\|$ für alle Reflexe.

 $^{^{}c}R_{free}$ berechnet aus R_{cryst} für ein Testset, der 5% der Reflexe enthält, die nicht für das Refinement genutzt wurden Zahlenwerte in Klammern stellen die entsprechenden Werte für die höchste Auflösungsschale dar.

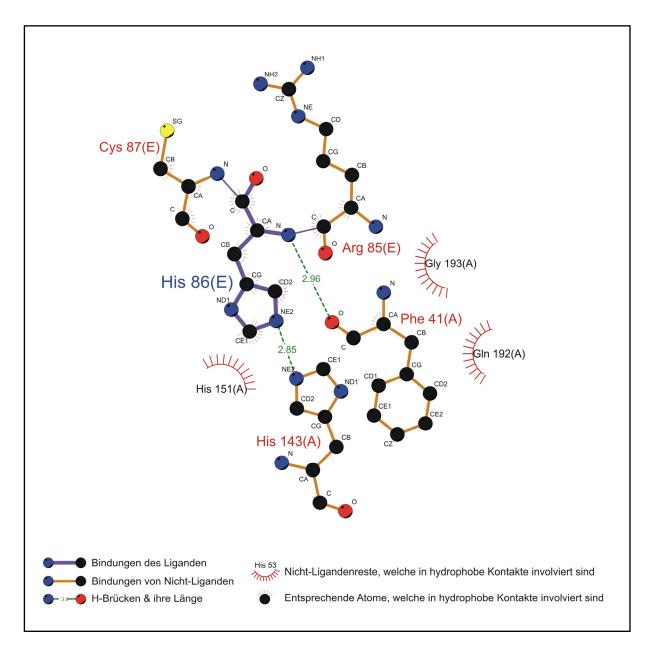
A.12 Ligplot des Tyr84 von YRH-Ecotin der Kette E aus der Kristallform V im Komplex mit b-Trypsiligase:



A.13 Ligplot des Arg85 von YRH-Ecotin der Kette E aus der Kristallform V im Komplex mit b-Trypsiligase:



A.14 Ligplot des His86 von YRH-Ecotin der Kette E aus der Kristallform V im Komplex mit b-Trypsiligase:



A.15 Tabellen der Abstände und Winkel zwischen dem Zn²⁺-Ion und seinen Interaktionspartnern in der Kristallform V von b-Trypsiligase im Komplex mit YRH-Ecotin:

A.15 Tabelle 1: Abstände vom Zn²⁺-Ion zu den Histidinen in b-Trypsiligase und YRH-Ecotin.

Interaktionspartner des Zn ²⁺ -Ions	Abstand zu Zn ²⁺ -Ions in Å
Nε2-Atom von His143 in b-Trypsin-Ligase (Kette B)	2,37
Nδ1-Atom von His151 in b-Trypsin-Ligase (Kette B)	3,10
Nε2-Atom von His86 in YRH-Ecotin (Kette F)	2,44

A.15 Tabelle 2: Abstände vom Zn²⁺-Ion zu den Histidinen in b-Trypsiligase und YRH-Ecotin.

Winkel einschließende Atome der Interaktion	Bindungswinkel in °
Nε2-His143 (b-Trypsiligase Kette B) Zn ²⁺ Nδ1-His151 (b-Trypsiligase Kette B)	95,1
Nε2-His143 (b-Trypsiligase Kette B) Zn ²⁺ Nε2-His86 (YRH-Ecotin Kette F)	111,3
Nδ1-His151 (b-Trypsiligase Kette B) Zn ²⁺ Nε2-His86 (YRH-Ecotin Kette F)	90,6

Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle all jenen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Dr. Milton T. Stubbs** dafür bedanken, dass er mir die Möglichkeit gab, diese Dissertation mit den interessanten Themen in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, sowie die Methode der Röntgenkristallstrukturanalyse zu erlernen. Des Weiteren möchte ich mich für seinen uneingeschränkten Optimismus bedanken, jedem Experiment etwas Positives abzugewinnen.

Mein besonderer Dank gilt **Dr. Christoph Parthier**, der sich immer Zeit für die experimentellen Probleme, schwierige Datensätze sowie für die Diskussion der erhaltenen Ergebnisse, die in Zusammenhang mit dieser Dissertation auftraten, genommen hat, sowie für seine Bereitschaft mir jede Frage in Hinblick auf die Röntgenkristallstrukturanalyse und der dabei verwendeten Programme zu beantworten.

Ich bedanke mich bei **Heidi Auerswald** und **Vicky Hellwig** für die durch sie beigesteuerten Ergebnisse, durch welche in Anlehnung an die hier bearbeiteten Themen einige offene Fragestellungen aufklärt werden konnten.

Bei **Pia Rosenburg** und **Uwe Fandrich** möchte ich mich für die Hilfe im Labor und besonders für die Herstellung zahlreicher zeitraubender Puffer für die Kristallisation bedanken.

PD Dr. Ulrich Arnold möchte ich für die Bereitstellung der DDDDK-RNase A, sowie für die gesamte Kooperation hinsichtlich verschiedenster Projekte danken.

Prof. Dr. Frank Bordusa und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die überaus angenehme Zusammenarbeit, die im Laufe dieser Dissertation stattfand, danken. Ein besonderer Dank gilt dabei **Dr. Sandra Liebscher** und **Ariunkhur Sharkhuukhen** für die Bereitstellung der für die Kristallisation und Analysen verwendeten Proteine sowie für die Diskussionen, die mit dem in dieser Dissertation behandelten Thema einhergingen.

PD Dr. Hauke Lilie danke ich für die Durchführung und Auswertung der Analytischen Ultrazentrifugation.

Für die Erlaubnis der Verwendung der Abbildungen aus seinem Buch "Biomolecular Crystallography" möchte ich mich bei Hofkristallrat a. D. Dr. Bernhard Rupp bedanken.

Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die Durchführung und Auswertung der Massenspektrometrie.

Bei der gesamten **Arbeitsgruppe Physikalische Biotechnologie** bedanke ich mich für das angenehme Arbeitsumfeld, die Diskussionsbereitschaft während der Kaffeepausen sowie für die sehr schönen Arbeitsgruppenausflüge und Unternehmungen.

Frau Martina Richter, in ihrer Funktion als Koordinatorin des GRK1026, möchte ich für die Regelung der bürokratischen und terminlichen Angelegenheit danken, was mir den Arbeitsalltag erleichterte.

Ich danke meinem Mitbewohner **Reno**, meinen **Freunden** und **Eltern** für die Unterstützung über den gesamten Zeitraum und ohne die diese Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Name: Michael Schöpfel

Geburtsdatum: 28. 10. 1984

Geburtsort: Bad Langensalza

1991 - 1995 Grundschule, Herbsleben

1995 - 2001 Sekundarstufe I, Salza-Gymnasium, Herbsleben

2001 - 2003 Sekundarstufe II, Salza-Gymnasium, Bad Langensalza

10/2003 - 10/2008 Studium der Biochemie, Martin-Luther-Universität, Halle/Wittenberg

12/2007 - 10/2008 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Titel: "Generierung

tryptophanhaltiger Varianten von Phospholipase A_2 - α aus Arabidopsis

thaliana für Stabilitätsstudien" in der Arbeitsgruppe Technische Enzymologie am Institut für Biochemie/Biotechnologie MLU

11/2008 - 11/2012 Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Milton T. Stubbs in der

Arbeitsgruppe Physikalische Biotechnologie am Institut für Biochemie/Biotechnologie MLU zum Thema: "*Trypsin: Eine Modellprotease für die Generierung neuer Biokatalysatoren*"

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt habe und dabei nur die angegebenen Hilfsmittel und Quellen zu Hilfe genommen habe. Die diesen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche gekennzeichnet. Des Weiteren sind alle von anderen Personen bereitgestellten Materialien als solche gekennzeichnet. Diese Dissertation wurde von mir an keiner anderen Hochschule oder Universität zur Begutachtung eingereicht.

Halle (Saale),den	
	Michael Schöpfel