

Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung

**Struktur-Funktionsstudien an rekombinant hergestellten
Varianten der Blutgerinnungsenzyme
Faktor IXa, Faktor Xa und Faktor VIIa**

Katrin Sichler

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

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. J. Buchner
Prüfer der Dissertation:	1. apl. Prof. Dr. Dr. h. c. R. Huber 2. apl. Prof. Dr. G.-B. Kreße, Ludwigs- Maximilians-Universität München 3. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Die Dissertation wurde am 20.03.01 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 04.05.01 angenommen.

Meinen Eltern

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Oktober 1997 bis Dezember 2000 bei der Roche Diagnostics GmbH, Pharma Research, Abteilung Molekularbiologie in Penzberg sowie am Max-Planck-Institut für Biochemie, Abteilung Strukturforschung in Martinsried durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Robert Huber für die Möglichkeit der Durchführung der Promotion und die große Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Wolfram Bode für die stetige Diskussionsbereitschaft und Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Herrn Dr. Erhard Kopetzki danke ich ganz besonders für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner Anleitung durchzuführen, und für die immerwährende Unterstützung bei allen kleineren und größeren Problemen sowie die aufmunternden Worte während den Durststrecken dieser Arbeit.

Mein besonders herzlicher Dank gilt den Herren Dr. Hans Brandstetter und Dr. Karl-Peter Hopfner für ihre ständige Diskussionsbereitschaft, ihre unschätzbare Hilfe in allen fachlichen und technischen Fragen und für ihre Geduld, mich in die Grundzüge der Kristallographie einzuweisen.

Herrn Prof. Dr. Georg-Burkhard Kreße und Frau Dr. Anne Stern danke ich aufrichtig für die großzügige Unterstützung der Arbeit durch die Firma Roche Diagnostics GmbH und die Möglichkeit, die vielfältige Infrastruktur des Bereichs Pharma Research frei nutzen zu können.

Für die Hilfe bei der Kristallisation und Datensammlung von rF7a möchte ich mich herzlich bei Dr. David Banner und Allan D'Arcy von der Hoffmann La Roche AG, Basel, bedanken.

Einen herzlichen Dank an meine Laborkollegen Petra Fink-Waldmüller, Annette Karcher, Dr. Thorsten Lemm, Christian Schantz, Rosalia Gallegos de Schrott, Klaus Weis und Nicole Wittenbrink sowie an alle Mitarbeiter der Abteilungen Molekularbiologie und Proteinchemie für die freundschaftliche, vertrauensvolle, hilfsbereite Atmosphäre und die vielen kurzweiligen Stunden.

Unvergessen werden die schönen Abende am Starnberger See und andere Runden mit den ehemaligen bzw. noch Doktoranden Dr. Thorsten Gutjahr, Dirk Schnäppchenjäger Demuth, Dr. Andrea Gnirke, Dr. Anja Haussmann, Dr. Barbara Zehentner, Christian Klein, Tanja Ligensa, Josef Preiherr, Nesrine Tarbe, Malte Weber und Vesna Evtimova bleiben.

Den Herren Dr. Richard A. Engh, Jochen Kluge und Rupert Lang danke ich für die fachlichen Diskussionen sowie die vielen tiefgründigen, kuriosen und erheiternden Runden im Zeichen der Hongkongbar, die ich sehr vermissen werde.

Allen Mitgliedern der Abteilung Strukturforschung danke ich für ihre ständige Hilfsbereitschaft bei allen kleineren und größeren Anwenderfragen und die stets kooperative Atmosphäre.

Ein herzliches Dankeschön an alle Freunde außerhalb des Labors, die mich während der vergangenen Jahre unterstützt und aufgebaut haben, besonders an Uta, Fiona, Andi, Dita, Ingo, Thieri und Bircki.

Ganz besonders danke ich meinen Eltern für ihr Vertrauen und ihre Unterstützung über all die Jahre.

Veröffentlichungen und Präsentationen, die Teile dieser Arbeit beinhalten:

Hopfner, K.P., Lang, A., Karcher, A., Sichler, K., Kopetzki, E., Brandstetter, H., Huber, R., Bode, W., Engh, R.A. (1999) Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure* 7, 989-996.

Sichler, K., Hopfner, K.P., Karcher, A., Lang, A., Kopetzki, E., Huber, R., Bode, W., Engh, R.A., Brandstetter, H. (1999) The crystal structure of truncated human coagulation factor IXa reveals an explanation for its poor amidolytic activity. Posterpräsentation bei "RAMC – Recent Advances in Macromolecular Crystallization", 22.-25.8.1999 in San Diego, CA, USA.

Engineering of Coagulation Factor Mutants: Structural and Kinetic Analysis (2000). Vortrag bei der 18. Winterschool über "Proteinases and their Inhibitors - Recent Developments", 8.-11.3.2000 in Tiers/Italien.

Sichler, K., Hopfner, K.P., Engh, R.A., Bode, W., Kopetzki, E., Brandstetter, H. (2000) Engineering of Coagulation Factor Mutants for Structural and Kinetic Analysis. Posterpräsentation bei der „Gordon Research Conference on Hemostasis“, 9.-14.7.2000 Plymouth, NH, USA.

Sichler, K., Brandstetter, H., Kopetzki, E., Engh, R.A., Bode, W., Hopfner, K.P. (2001) New insights into FIXa's poor amidolytic activity - breaking it down to single residues. Vortrag bei der 19. Winterschool über "Proteinases and their Inhibitor - Recent Developments", 28.2.-4.3.2001 in Tiers/Italien.

INHALTSVERZEICHNIS

I	Zusammenfassung	1
II	Einleitung	5
II.1	Hämostase	5
II.1.1	Die Gerinnungskaskade	5
II.1.2	Die Faktor IX-Genfamilie	8
II.1.3	Bedeutung von Faktor IXa und Kontrolle seiner Aktivität	9
II.1.4	Regulation der Aktivität von Faktor Xa	10
II.1.5	Die Aktivität von Faktor VIIa wird auf vielen Ebenen reguliert	10
II.2	Strukturelle Grundlagen der Aktivität von FIXa, FXa und FVIIa	12
II.2.1	Spezifitätsdeterminanten in Serinproteasen	12
II.2.2	Spezifitätsdeterminanten innerhalb der Faktor IX-Genfamilie	13
II.2.3	Strukturelle Grundlagen der unterschiedlichen Aktivität von FIXa und FXa	14
II.3	Konsequenzen einer gestörten Hämostase	16
II.4	Rekombinante Produktion von Gerinnungsproteasen	17
II.4.1	Kristallisationsmodell für Faktor X: rXYa	18
II.4.2	Inclusion bodies	19
II.4.3	Renaturierung von Inclusion Bodies	20
II.5	Kristallographie	22
II.5.1	Kristallstrukturanalyse	22
II.5.1.1	Kristallisation von Proteinen	22
II.5.1.2	Kristalle	23
II.5.1.3	Beugung von Röntgenstrahlen	23
II.5.1.4	Berechnung der Elektronendichte	24
II.5.1.5	Lösung des Phasenproblems	25
II.5.1.5.1	Molekularer Ersatz mit der Pattersonsuche	25
II.5.1.6	Modellbau und Verfeinerung	26
II.6	Ziele und Inhalt der Arbeit	27
II.6.1	Einfluss von Mutationen in der Substratbinderegion auf die Aktivität von rF9a	27
II.6.1.1	Untersuchung der S2-S4-Binderegion von rF9a	27
II.6.1.2	Untersuchung der S1-Tasche von rF9a	27
II.6.2	Herstellung von rF7a aus <i>E. coli</i> inclusion bodies für die Kristallisation	27
II.6.3	Verbesserung des FXa-Kristallisationsmodells rXYa: Untersuchung der S1-Tasche	28
III	Material und Methoden	29
III.1	Material	29
III.1.1	Chemikalien und biochemische Reagenzien	29
III.1.2	Geräte und Verbrauchsmaterialien	29
III.1.3	Puffer und Lösungen	30
III.1.4	Bakterienstamm	31
III.1.5	Nährmedien	32
III.1.6	Plasmide	32
III.1.6.1	PSA	32
III.1.6.2	pUBS520	32
III.1.7	Oligonukleotide	33
III.2	Methoden	35
III.2.1	Molekularbiologische Methoden	35
III.2.1.1	Isolierung von DNA	35
III.2.1.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	35

III.2.1.1.2	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	35
III.2.1.2	Charakterisierung von DNA	35
III.2.1.2.1	Konzentrationsbestimmung von DNA	35
III.2.1.2.2	Restriktionsanalyse	35
III.2.1.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	36
III.2.1.2.4	Sequenzierung	36
III.2.1.3	Mutagenese von DNA	36
III.2.1.3.1	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	36
III.2.1.3.2	PCR-Mutagenese	37
III.2.1.4	Klonierung in <i>E. coli</i>	39
III.2.1.4.1	Präparativer Verdau	39
III.2.1.4.2	Ligation	39
III.2.1.4.3	Transformation	39
III.2.1.4.4	Analyse der Transformanden	39
III.2.1.4.5	Expressionsanalyse	39
III.2.2	Proteinanalytische Methoden	40
III.2.2.1	Polyacrylamid - Gelelektrophorese	40
III.2.2.1.1	SDS-PAGE	40
III.2.2.1.2	Native PAGE	40
III.2.2.2	Western-Blot-Analyse	40
III.2.2.3	Konzentrierung von Proteinen	41
III.2.2.3.1	Konzentrierung durch Fällung	41
III.2.2.3.1.1	TCA-Fällung	41
III.2.2.3.1.2	Na-DOC Fällung	41
III.2.2.3.2	Konzentrierung durch Ultrafiltration	41
III.2.2.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	42
III.2.3	Herstellung rekombinanter Gerinnungsproteasen	42
III.2.3.1	Allgemeines	42
III.2.3.1.1	Umpuffern durch Dialyse	42
III.2.3.2	Präparative Expression	42
III.2.3.2.1	Labormaßstab	42
III.2.3.2.2	Fermentationsmaßstab	42
III.2.3.3	Reinigung der Inclusion Bodies	43
III.2.3.3.1	Labormaßstab	43
III.2.3.3.2	Fermentationsmaßstab	43
III.2.3.4	Solubilisierung der Inclusion Bodies	43
III.2.3.5	Naturierung von Inclusion Body Protein	44
III.2.3.5.1	Standardverfahren für die Naturierung von rekombinanten Serinproteasen	44
III.2.3.5.2	Optimierung eines Renaturierungsverfahrens für rekombinanten Faktor VII	44
III.2.3.5.2.1	Untersuchung der Naturierungseffizienz	45
III.2.3.5.2.2	Bestimmung freier SH-Gruppen mit Ellman's Reagens	45
III.2.3.6	Reinigung der Enzyme	45
III.2.3.6.1	Reinigung der Zymogene	45
III.2.3.6.1.1	rF9, rF10 und rXY	45
III.2.3.6.1.2	rF7	45
III.2.3.6.2	Aktivierung	46
III.2.3.6.2.1	Aktivitätsassays	46
III.2.3.6.2.2	Aktivierung von rF9	47
III.2.3.6.2.3	Aktivierung von rF10	47
III.2.3.6.2.4	Aktivierung von rXY	47
III.2.3.6.2.5	Aktivierung von rF7	47
III.2.3.6.3	Reinigung der aktiven Enzyme	47
III.2.3.6.3.1	rTry	47
III.2.3.6.3.2	rXYa	48
III.2.3.6.3.3	rF9a	48
III.2.3.6.3.4	rF10a	48
III.2.4	Enzymatische Methoden	48
III.2.4.1	Titration der aktiven Zentren	48
III.2.4.1.1	rTrya, rXYa und Thrombin	49
III.2.4.1.2	ATIII	49
III.2.4.1.3	rF9a und rF10a	49
III.2.4.2	Untersuchung katalytischer Eigenschaften	49

III.3	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	51
III.3.1	Kristallisation von Proteinen	51
III.3.2	Datensammlung und Datenauswertung	51
III.3.2.1	rXYa S190A	51
III.3.2.2	rF7a	51
III.3.3	Pattersonsuche	51
III.3.4	Modellbau und Verfeinerung	52
IV	Ergebnisse	53
IV.1	Untersuchung von Determinanten für die geringe amidolytische Aktivität von Faktor IXa	53
IV.1.1	Herstellung, Aufreinigung und Aktivierung der Varianten von rF9a	53
IV.1.2	Einfluss von Mutationen in der Substratbinderegion auf die Aktivität von rF9a	53
IV.1.2.1	Untersuchung der S2-S4-Binderegion von rF9a	53
IV.1.2.2	Untersuchung der S1-Tasche von rF9a	57
IV.1.3	Einfluss der Mutationen in der Substratbinderegion auf die Selektivität von rF9a	58
IV.1.4	Wechselwirkung von Ethylenglycol mit dem 99-Loop	59
IV.2	Etablierung eines Renaturierungsverfahrens für rekombinanten Faktor VII	61
IV.2.1	Herstellung verschiedener Chimären und Konstrukte von rF7	62
IV.2.1.1	Verlängerung des Aktivierungspeptids von rF7	62
IV.2.1.2	Chimären verschiedener Gerinnungsenzyme	63
IV.2.1.3	Verlängerung von rF7	63
IV.2.1.4	Suche nach geeigneten Renaturierungsbedingungen für rF7	64
IV.2.1.5	Optimierung der anfänglichen Renaturierungsbedingungen	64
IV.2.1.5.1	Optimierung der Arginin- und Ethylenglycolkonzentration für die verschiedenen Konstrukte	64
IV.2.1.5.2	Optimierung weiterer Parameter der Renaturierung von rF7	66
IV.2.1.5.2.1	Optimierung der Pufferzusammensetzung	67
IV.2.1.5.2.2	Optimierung der Cysteinkonzentration	67
IV.2.1.5.2.3	Optimierung der Proteinzugabe	69
IV.2.1.5.2.4	Temperatur	69
IV.2.1.6	Optimierte Renaturierungsbedingungen für rF7	69
IV.2.2	Aufreinigung von rF7	70
IV.2.3	Aktivierung von rF7	70
IV.2.4	Biochemische Charakterisierung von rF7a	71
IV.2.4.1	Ethylenglycol stimuliert die Aktivität von rF7a	71
IV.2.5	Vergleich der Renaturierung von rF7 und rF9	73
IV.3	Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von rF7a	75
IV.3.1	Kristallisation von rF7a	75
IV.3.2	Röntgenstrukturanalyse des Komplexes von rF7a mit Benzamidin	76
IV.3.2.1	Datensammlung	76
IV.3.2.2	Modellbau und Verfeinerung	76
IV.3.2.3	Strukturbeschreibung	78
IV.3.2.3.1	Überblick	78
IV.3.2.3.2	Konformation des aktiven Zentrums und Bindung des Inhibitors Benzamidin in rF7a ^{BA}	78
IV.3.2.3.3	170-Loop und intermediäre Helix	79
IV.3.2.3.4	Weitere Liganden in rF7a ^{BA}	81
IV.3.2.3.4.1	Sulfate	81
IV.3.2.3.4.2	Glycerin	81
IV.3.2.3.5	Konformation der EGF2-Domäne	82
IV.3.3	Röntgenstrukturanalyse von freiem rF7a	83
IV.3.3.1	Vorbereitung des Kristalls	83
IV.3.3.2	Datensammlung	84
IV.3.3.3	Modellbau und Verfeinerung	84
IV.3.3.4	Strukturbeschreibung	86
IV.3.3.4.1	Konformation der Aktivierungsdomäne von rF7a	86
IV.3.3.4.2	Konformation des 170-Loops von rF7a	87
IV.3.3.4.3	Ca ²⁺ -Bindeschleife und Zn ²⁺ -Bindung	87
IV.3.3.4.4	Konformation der EGF2-Domäne von rF7a	87

IV.3.3.4.5	Ethylenglycol	88
IV.3.3.4.6	Vergleich der Bindestellen für Ethylenglycol und Glycerin in rF7a, FIXa und FXa	89
IV.4	Angleich der S1-Tasche von rXYa an die S1-Tasche von FXa	91
IV.4.1	Herstellung, Aufreinigung und Aktivierung der Varianten von rF10a, rF9a, rXYa und Trypsin	91
IV.4.2	Biochemische Untersuchung der Bedeutung von Serin/Alanin 190 für die amidolytische Aktivität von Trypsin, rXYa, rF10a und rF9a	91
IV.4.2.1	Einfluss von Rest 190 auf das Selektivitätsprofil in S2-S4	94
IV.4.2.2	Einfluss von Rest 190 auf die Arginin- und Lysin- Selektivität der S1-Tasche in Trypsin, rXYa, rF10a und rF9a	96
IV.4.2.2.1	Selektivitätsänderung in der S1-Tasche durch Ser/Ala 190	96
IV.4.2.2.2	Einfluss von Ser/Ala 190 auf die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m	97
IV.4.2.2.3	Genauere Analyse der kinetischen Parameter k_{cat} und K_m in Abhängigkeit von Ser/Ala 190	98
IV.5	Röntgenstrukturanalyse von rXYa S190A	100
IV.5.1	Kristallisation von rXYa S190A	100
IV.5.2	Datensammlung und Pattersonsuche	100
IV.5.3	Modellbau und Verfeinerung	101
IV.5.4	Strukturbeschreibung	103
IV.5.4.1	Allgemeine Beschreibung	103
IV.5.4.2	Wechselwirkung des FXa-Inhibitors 34755 mit dem aktiven Zentrum	104
IV.5.4.3	Vergleich der Substratbinderegion von XY190 mit derjenigen von Faktor Xa und Trypsin	105
IV.5.4.4	Die Ca^{2+} -Bindeschleife von XY und XY190 hat eine ungewöhnliche Konformation	107
V	Diskussion	109
V.1	Untersuchung der Determinanten für die geringe amidolytische Aktivität von FIXa	109
V.1.1	Der 99-Loop ist für die geringe amidolytische Aktivität von FIXa verantwortlich	109
V.1.1.1	Tyrosin 99 stabilisiert den 99-Loop	109
V.1.1.2	Ladung und Länge von Lysin 98 behindern die Substratbindung in S1	110
V.1.1.3	Die Länge des 99-Loops in FIXa ist nicht entscheidend für die Aktivität	111
V.1.1.4	Der 99-Loop wird im Komplex mit FVIIIa und FX umorientiert und ermöglicht dann die Substratbindung	111
V.1.2	Die S1-Tasche von FIXa wird durch Glu219 stabilisiert	114
V.2	Herstellung und Kristallisation von rF7a	115
V.2.1	Renaturierung	115
V.2.2	Röntgenstrukturanalyse von rF7a ^{BA} und rF7a	115
V.3	Ethylenglycol stimuliert die Aktivität von FIXa durch Wechselwirkung mit dem 99-Loop und bindet in FVIIIa in der Nähe des 60-Loops	117
V.4	Verbesserung von rXYa als Modell für FXa	119
V.4.1	Ein Serin/Alanin-Austausch an Position 190 beeinflusst nur die Spezifität der S1-Tasche und nicht die der S2-S4-Taschen	119
V.4.2	Serin/Alanin 190 haben einen vergleichbaren Einfluss auf die S1-Selektivität in mehreren verwandten Serinproteasen	120
V.4.2.1	K_m	120
V.4.2.2	k_{cat}	120
V.4.3	rF9a hat eine besonders hohe Selektivität für Arginin-P1-Reste	121
V.4.4	rF9a Ala190 und rF10a Ala190 haben eine erhöhte Reaktivität gegen Argininsubstrate	122
V.4.5	rXYa S190A hat FXa-, Trypsin- und neue Eigenschaften	122
V.4.6	rXYa S190A ist ein geeignetes Kristallisationsmodell für Faktor Xa	123
VI	Literaturverzeichnis	125
VII	Abkürzungen	133

I ZUSAMMENFASSUNG

Das hämostatische System ist von großer Bedeutung für alle höheren Organismen. Es gewährleistet die Integrität des Gefäß- und Kreislaufsystems und stellt dessen Funktionsweise nach Verletzungen schnell wieder her. Seine Regulation ist von herausragender Bedeutung und erfolgt auf verschiedenen Ebenen und über eine Reihe von Kontrollmechanismen. Eine Unterfunktion des hämostatischen Systems resultiert in Bluterkrankheiten, eine Überfunktion führt zu thrombotischen Erkrankungen.

Für die Entwicklung wirkungsvoller Inhibitoren gegen einzelne Mitglieder der Gerinnungskaskade ist es nötig, die genauen Eigenschaften der verschiedenen Enzyme zu kennen, zu verstehen und gegen die verwandten Enzyme abgrenzen zu können. In diesem Zusammenhang sind Kristallstrukturen ein wertvolles Werkzeug, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Enzymen verstehen zu lernen und die Bindeeigenschaften von spezifischen Inhibitoren zu optimieren.

Die Kristallisation von Gerinnungsfaktoren ist jedoch schwierig, da die Enzyme eine für die Kristallpackung ungünstige gestreckte Konformation haben. In vorangegangenen Arbeiten wurden daher verkürzte Varianten von Faktor IXa (FIXa) und Faktor Xa (FXa) für Struktur-Funktionsstudien entwickelt (rF9a und rF10a). Diese Varianten werden über Renaturierung von *E. coli* Inclusion Bodies hergestellt. In diesem System lassen sich schnell verschiedene Mutanten der Enzyme erzeugen, anhand derer die Bedeutung einzelner Reste oder Oberflächenschleifen für Aktivität und Spezifität untersucht werden können.

Faktor IXa nimmt eine zentrale Rolle in der Gerinnungskaskade ein, da in ihm die verschiedenen Wege der Initiation und Aufrechterhaltung der Blutgerinnung zusammenlaufen.

FIXa zeichnet sich durch eine besonders niedrige Aktivität aus. Die Bindung des Kofaktors FVIIIa ist nicht ausreichend, um die amidolytische Aktivität des Enzyms zu verbessern, sondern FIXa entfaltet erst im Komplex mit dem Kofaktor und dem physiologischem Substrat FX seine volle Aktivität.

Die Ursache für die niedrige Aktivität wurde schon seit längerem in Besonderheiten des 99-Loops vermutet. Dieser Loop ist in FIXa länger als in verwandten Enzymen und nimmt eine ungewöhnliche Konformation ein, durch die die kanonische Bindung des Substrats behindert wird. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Reste Lys98 und Tyr99 von entscheidender Bedeutung für die Eigenschaften des freien FIXa sind.

Austausch des Tyr99 gegen Aminosäuren mit kleineren Seitenketten führte zu einer starken Aktivitätsverschlechterung, die vermutlich auf ein Nachrutschen der Schleife in Richtung der Substratbinderegion mit daraus resultierender stärkerer Behinderung der Substratbindung zurückzuführen ist. Tyr99 behindert somit zwar die Substratbindung in FIXa, ist aber auch für die Stabilität des 99-Loops unabdingbar. Mutagenese von Lys98 zeigte, dass dieser Rest durch die Ladung und Lage seiner langen Seitenkette die Bindung der basischen Substratseitenketten in die S1-Tasche stört. Austausch des Lysin gegen ungeladene oder kürzere Reste resultierte in Enzymen mit stark verbesserter Aktivität. Die Aktivität konnte weiter gesteigert werden, wenn zwei weitere Mutationen in den Positionen 94 und 177 eingeführt wurden, die eine Umlagerung des Loops in eine FXa-ähnliche Konformation ermöglichten.

Die Umlagerung des 99-Loops in der Tripelmutante entspricht vermutlich der Bewegung, die der 99-Loop im physiologischen Komplex nach der Bindung von Kofaktor und Substrat durchführt. Durch die Bindung der makromolekularen Interaktionspartner wird die Substratbindungsregion von FIXa zugänglich und eine effiziente Katalyse möglich.

Die Untersuchung von Glu219 in der S1-Tasche zeigte, dass dieser Rest in FIXa zwar ungewöhnlich und einzigartig, aber trotz seiner energetisch ungünstigen Hauptkettenkonformation für Integrität und Stabilität der S1-Tasche von FIXa optimiert ist.

Eine weitere wichtige Komponente des Gerinnungssystems ist FVII. FVII steht ganz am Beginn der Gerinnungskaskade und ist das erste Enzym, das nach einer Verletzung aktiviert wird. Die Kontrolle der Aktivität von FVIIa ist dementsprechend wichtig und stellt einen attraktiven Ansatzpunkt für die Thromboseprävention dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Verfahren für die Herstellung von rekombinantem verkürztem FVIIa (rF7a) aus *E. coli* Inclusion Bodies etabliert. Die Renaturierung von rF7a unterscheidet sich deutlich von derjenigen der nahe verwandten Enzyme rF9a und rF10a und ist nur in Gegenwart hoher Konzentrationen an Ethylenglycol erfolgreich. Das optimierte Verfahren führte zu einer durchschnittlichen Ausbeute von 3mg reinem Enzym je Liter Fermentationsansatz.

rF7a konnte in Gegenwart des nichtkovalenten Inhibitors Benzamidin erfolgreich kristallisiert werden. Die Kristalle streuten bei Synchrotronstrahlung bis zu einer Auflösung von 1,69 Å. Der Inhibitor Benzamidin konnte aus dem aktiven Zentrum gewaschen werden und kann in der vorliegenden Kristallform prinzipiell durch andere niedermolekulare Inhibitoren ersetzt werden, um deren Bindeeigenschaften zu untersuchen.

Die Kristallstrukturen von rF7a mit Benzamidin (rF7a^{BA}) sowie von rF7a ohne gebundenen Inhibitor wurden gelöst. rF7a^{BA} wies im Wesentlichen die gleiche Konformation wie bereits publizierte Strukturen von kovalent inhibiertem oder komplexiertem FVIIa auf. Dies belegt, dass die Renaturierung des Enzyms erfolgreich war und dass die Bindung des kleinen kompetitiven Inhibitors Benzamidin ausreichend für die Stabilisierung der aktiven Konformation von rF7a ist. Im freien Enzym war eine leichte Destabilisierung von Teilen der S1-Tasche und der Aktivierungsdomäne zu beobachten. Diese Beobachtung unterstützt die auf zahlreichen biochemischen Untersuchungen basierende These, dass FVIIa ohne Bindung seines Substrats oder Kofaktors in einer zymogenartigen Konformation mit ungeordneter Aktivierungsdomäne und Substratbindungsregion vorliegt. Die aktive Konformation wird durch Bindung von TF im Bereich der intermediären Helix, sowie durch Besetzung der S1-Tasche stabilisiert.

Eine Besonderheit von FVIIa und FIXa besteht in der Stimulierbarkeit ihrer Aktivität durch Ethylenglycol und Glycerin. Untersuchungen an FIXa-Mutanten in dieser und anderen Arbeiten deuten darauf hin, dass diese Stimulation über eine Beeinflussung des 99-Loops erfolgt.

In den Kristallstrukturen von rF7a^{BA} und rF7a konnten ein Glycerin- bzw. Ethylenglycolmolekül in einer Tasche zwischen dem 60-Loop und dem Bereich vor dem 99-Loop lokalisiert werden. In FXa, welcher durch die Alkohole nicht stimuliert werden kann, ist eine Bindung in dieser Tasche nicht möglich, da sie durch die Seitenketten von Tyr60 und Lys90 ausgefüllt wird. Diese Bindestelle ist relativ weit vom „eigentlichen“ 99-Loop entfernt, und aus der Kristallstruktur geht nicht hervor, ob sie in einem funktionellen Zusammenhang mit der Stimulation steht.

In vorangegangenen Arbeiten war eine chimäre Kristallisationsmutante (rXY) für FXa entwickelt worden, bestehend aus einer katalytischen Domäne mit der N-terminalen Subdomäne von FXa und der C-terminalen Subdomäne von Trypsin.

Die S1-Tasche dieser Chimäre wurde durch Austausch von Ser190 gegen Ala weiter an die Situation in FXa angeglichen. Im Zuge dieser Anpassung wurde der Einfluss von Ser/Ala190 auf die P1-Substratelektivität in rXY, rF10a, rF9a und Trypsin untersucht. Es zeigte sich, dass die Bedeutung dieses Restes für die P1-Selektivität in allen untersuchten Enzymen ähnlich war, unabhängig von der Ausgangslektivität oder absoluten Reaktivität der Enzyme.

Die Selektivität für Arginin in P1 war in den Enzymen mit Ala190 etwa fünffach höher als in den Ser190-Enzymen. Diese Beobachtung unterstreicht die starke Konservierung von Konformation und Funktion der S1-Tasche in den trypsinartigen Serinproteasen.

Es wurde allerdings auch deutlich, dass in allen Fällen der jeweilige Wildtyp optimiert war. In allen Mutanten war die katalytische Effizienz leicht erniedrigt. Darüber hinaus zeigte eine genauere Analyse der kinetischen Parameter, dass eine starke Bindung des Substrats nicht unbedingt vorteilhaft für die Katalyse sein muss. Für Arginin P1-Reste war k_{cat} bei Ala190 höher als bei Ser190, für Lysin P1-Reste war die Situation umgekehrt. Eine zu starke Bindung des Substrats kann die für eine optimale Positionierung im aktiven Zentrum erforderlichen Freiheitsgrade also zu stark einschränken.

Die Variante rXYa Ser190Ala konnte im Komplex mit einem FXa-Inhibitor kristallisiert werden. Die Bindung des Inhibitors in das aktive Zentrum von rXYa Ser190Ala gibt ein realistisches Abbild seiner Bindung in FXa, da der Großteil der genutzten Substratbinderegion von FXa-Resten gebildet wird oder in Trypsin und FXa identisch ist. rXYa Ser190Ala stellt somit ein geeignetes Kristallisationsmodell für FXa dar, welches eine bessere Aussage über den Bindemodus von FXa-Inhibitoren erlaubt, als dies mit dem bisher häufig verwendeten Kristallisationsmodell Trypsin möglich ist.

II EINLEITUNG

II.1 Hämostase

Bei höheren Organismen ist es von besonderer Bedeutung, dass Defekte im Blutgefäßsystem schnell und zuverlässig abgedichtet werden, um den drohenden Blutverlust auf ein Minimum zu begrenzen.

Diese Funktion erfüllt das hämostatische System, dessen vaskuläre (Blutgefäßsystem), zelluläre (Thrombozyten) und plasmatische (Gerinnungsfaktoren) Komponenten zusammenspielen, um eine rasche Blutungsstillung (Hämostase) zu erzielen.

Das Gerinnsel besteht in erster Linie aus Thrombozyten (Blutplättchen), welche an der verletzten Stelle aktiviert werden, sich anheften und diverse die Gerinnung stimulierende Faktoren freisetzen. Der Plättchenpfropf (Thrombus) wird durch die Bindung und Quervernetzung von Fibrin, welches im Verlauf der Gerinnungskaskade gebildet wird, stabilisiert.

Die Blutungsstillung muss räumlich eng begrenzt ablaufen und einer strengen Regulation unterliegen, um eine unkontrollierte Gerinnselbildung und Gefäßverschluß (Thrombose) zu vermeiden. Bereits kurz nach der Aktivierung der Blutgerinnung wird auch das fibrinolytische System aktiviert, welches für die langsame Auflösung der Gerinnsel verantwortlich ist.

Im strömenden Blut stehen hämostatisches und fibrinolytisches System sowie diverse Inhibitoren der Blutgerinnung im Fließgleichgewicht miteinander. Erst bei einem äußeren Stimulus wie z.B. Verletzung entsteht ein Ungleichgewicht, in dessen Verlauf die Hämostase eingeleitet wird. Eine ausführliche Beschreibung der verschiedenen Komponenten des hämostatischen Systems findet sich z.B. in Rock et al., 1997.

II.1.1 Die Gerinnungskaskade

In der Gerinnungskaskade werden in einer Serie von Reaktionen mehrere Gerinnungsfaktoren aktiviert, was letztlich in der Bildung von Thrombin resultiert. Thrombin seinerseits wandelt Fibrinogen in Fibrin-Monomere um, welche quervernetzt werden und den Thrombus stabilisieren.

Die Proteine der Gerinnungskaskade zirkulieren als inaktive Vorstufen im Plasma. Sie lassen sich größtenteils in zwei Gruppen einteilen: Zymogene von Serinproteasen der Chymotrypsin-Familie, und spezifische Kofaktoren für die korrekte Ausbildung der Aktivität der Enzyme (Tabelle II-1). Weitere Komponenten der Gerinnungskaskade sind Ca^{2+} - und Mg^{2+} - Ionen sowie negativ geladene Phospholipide.

Die Aktivierung der Vorstufen erfolgt in allen Fällen über limitierte Proteolyse.

Je nach Art der Aktivierung unterscheidet man historisch bedingt (Davie et al., 1964 und MacFarlane, 1964) zwischen dem extrinsischen und dem intrinsischen Weg der Blutgerinnung, welche ab der Bildung von Faktor IXa in einen gemeinsamen Pfad münden (Abbildung II-1).

Während früher dem intrinsischen Weg eine hohe Bedeutung in der Initiation der Gerinnung beigemessen wurde, geht man in neueren Modellen davon aus, dass die Initiation primär über der extrinsischen Weg erfolgt, und der intrinsische Weg für die Aufrechterhaltung der Fibrinbildung sorgt.

Tabelle II-1: Komponenten der Gerinnungskaskade. Nach Furie, 1988 und Karlson et al., 1994.

Komponente	Trivialname	Größe (Da)	µg/ml Plasma	Funktion
Faktor I	Fibrinogen	340.000	3.000	strukturell
Faktor II	Prothrombin	72.000	100	Protease-Zymogen
Faktor III	Tissue Faktor	37.000	0	Kofaktor für FVII(a)
Faktor IV	Ca ²⁺	40	100	strukturell für Komplexe
Faktor V	Proaccelerin	330.000	10	Kofaktor für FXa
Faktor VII	Proconvertin	50.000	0,5	Protease-Zymogen
Faktor VIII	Antihämophiler Faktor	330.000	0,1	Kofaktor für FIXa
Faktor IX	Christmas-Faktor,	56.000	5	Protease-Zymogen
	Plasmathromboplastin Komponente			
Faktor X	Stuart-Prower-Faktor,	56.000	10	Protease-Zymogen
	Plasmathromboplastin 1			
Faktor XI	Plasmathromboplastin Antecedent	160.000	5	Protease-Zymogen
Faktor XII	Hagemann Faktor	80.000	30	Protease-Zymogen
Faktor XIII	Fibrinstabilisierender Faktor,	300.000	10-40	Prä-Transamidase
	Transglutaminase			
vWF	von Willebrand Faktor	(225.000) _n	10	Stabilisierung von FVIII; Plättchenadhäsion
PKK	Präkallikrein, Fletcher-Faktor	90.000	40	Protease-Zymogen
Kininogen	Fitzgerald-Faktor	180.000	60	Kofaktor für FXIIa
Protein C		62.000	4	Protease-Zymogen
Protein S		80.000	25	Kofaktor für Protein Ca (APC)
Antithrombin III		65.000	250	Inhibitor von Thrombin, FIXa, FXa
TFPI	tissue factor pathway inhibitor	34.000	0,1	Inhibitor des FX-TF-FVIIa Komplexes
Thrombomodulin		75.000	0	Modulation der Thrombin-spezifität

Für die Aktivierung des **extrinsischen Systems** ist Tissue Faktor (TF) notwendig, ein integrales Membranprotein auf Endothelzellen. Nach Gefäßverletzungen kommt TF in Kontakt mit dem Blut und bindet den dort zirkulierenden Faktor VII/VIIa (FVII/FVIIa). Es kommt daraufhin in Gegenwart von Ca²⁺ zu einer vermutlich autokatalytischen Aktivierung von FVII zu FVIIa. Der TF/FVIIa Komplex aktiviert die beiden Zymogene FIX und FX. FIXa bildet daraufhin zusammen mit seinem Kofaktor VIIIa und Ca²⁺ auf negativen Phospholipid-Oberflächen den Faktor X aktivierenden Komplex (*Xase*). Dieser aktiviert FX zu FXa, welcher zunächst in Gegenwart von Ca²⁺ und Phospholipiden seinen Kofaktor FV aktiviert (Monkovic et al., 1990) und anschließend zusammen mit FVa und Ca²⁺ auf negativen Phospholipid-Oberflächen den Prothrombinase-Komplex formt und Prothrombin zu Thrombin aktiviert. Thrombin seinerseits aktiviert dann Fibrinogen und das Fibrin quervernetzende Enzym FXIII, außerdem auch die Kofaktoren FV und FVIII sowie über FXI das intrinsische System. Dadurch wird über einen Rückkoppelungsmechanismus die Bildung von FIXa, FXa und Thrombin verstärkt.

Der **intrinsische Pfad** wird über die so genannte *Kontaktaktivierung* eingeleitet. Durch den Kontakt von Blut mit negativ geladenen Oberflächen (membranständige Sulfatide oder Kollagen *in vivo*, Glas *in vitro*) kommt es über Präkallikrein (PKK) zu einer Aktivierung von FXII, welcher wiederum mit HMW Kininogen als Kofaktor FXI aktiviert. FXII, PKK und HMW Kininogen sind für eine normale Gerinnung nicht notwendig. Daher spielt die Initiation der Gerinnung über die Kontaktaktivierung *in vivo* offenbar eine untergeordnete Rolle. Wichtiger ist vielmehr die Thrombin-vermittelte Aktivierung von FXI und die damit bewirkte Verstärkung der Thrombinbildung.

Die Gerinnung unterliegt einer strengen **Kontrolle**, um auf den Ort der Verletzung begrenzt zu bleiben. Sofort nach Aktivierung des extrinsischen Pfads wird dieser durch TFPI (tissue factor pathway inhibitor) herunterreguliert. TFPI bindet FXa und den TF/FVIIa Komplex und inhibiert so die FX Aktivierung. Somit wird das Gewicht sehr schnell vom extrinsischen zum intrinsischen System verlagert.

Eine große Bedeutung kommt auch dem Serpin Antithrombin III zu. Es inhibiert Thrombin, FIXa und FXa und kann dadurch die Fibrinbildung vollständig unterbinden. Allerdings ist diese Reaktion relativ langsam, sodass zunächst genügend Fibrin zur Stabilisierung des Plättchenpfropfs gebildet werden kann.

Thrombomodulin spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Regulation der Gerinnung. Dieses auf Endothelzellen vorkommende Glycoprotein bindet Thrombin und ändert dessen Substratspezifität dahingehend, dass Thrombin nun bevorzugt Protein C (PC) aktiviert (\rightarrow APC). Diese Serinprotease inaktiviert daraufhin in Gegenwart von Protein S die Kofaktoren FVa und FVIIIa.

Ein weiterer Sicherheitsmechanismus besteht darin, dass alle Reaktionen, die zur Aktivierung von Thrombin führen, an negativ geladenen Phospholipid-Oberflächen stattfinden müssen. Diese Oberflächen sind lediglich auf Endothelzellen und aktivierten Plättchen, nicht jedoch auf unverletzten Regionen vorhanden. Damit begrenzt auch diese Oberflächenabhängigkeit die Blutgerinnung auf die verletzte Stelle.

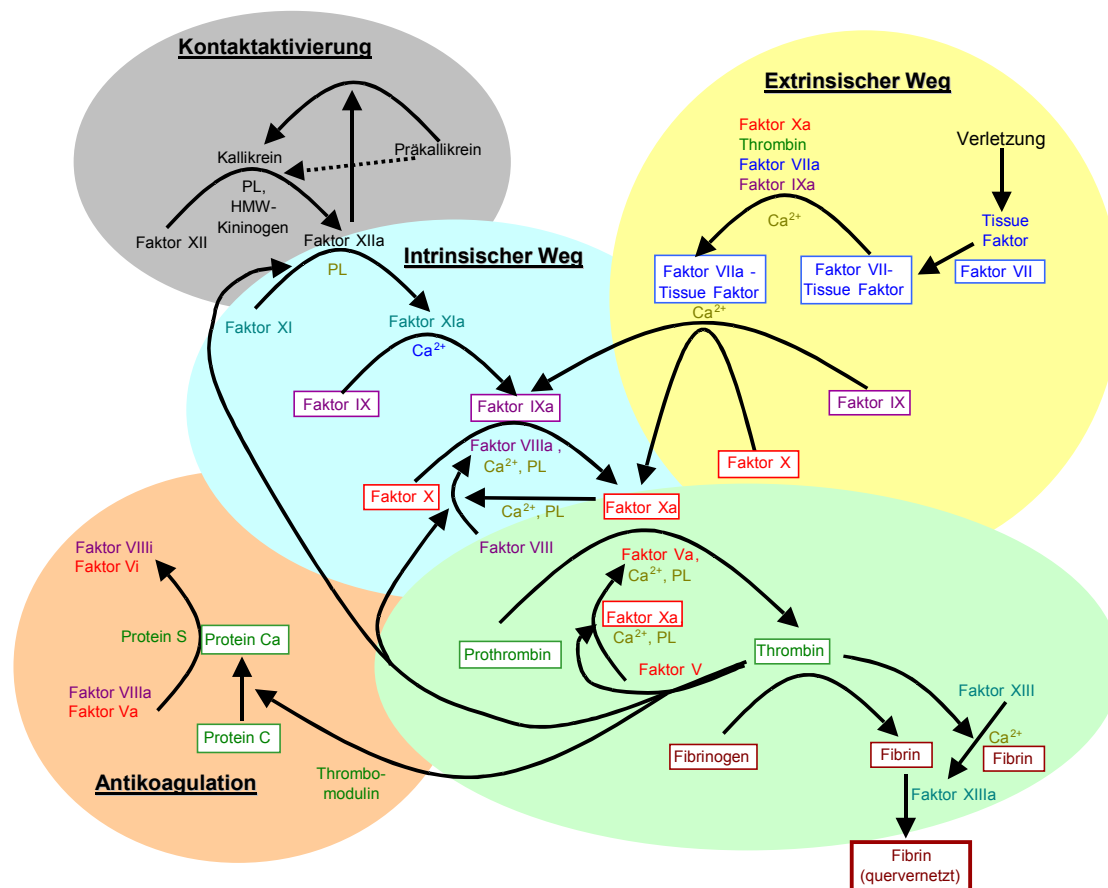


Abbildung II-1: Die Gerinnungskaskade. Nach Davie et al., 1991 und Karlson et al., 1994. Die Mitglieder der Faktor IX-Genfamilie sowie Thrombin und Fibrin sind weiß unterlegt. Die Pfeile verdeutlichen proteolytische Aktivierung der Vorstufen. PL: negativ geladene Phospholipide auf Endothelzellen oder aktivierten Plättchen.

II.1.2 Die Faktor IX-Genfamilie

Die Gerinnungsproteasen FVII, FIX, FX und PC haben eine hohe Sequenzhomologie (etwa 40%, Neurath, 1984) sowie eine konservierte Intron-Exon- und Domänen-Struktur (Abbildung II-2). Sie stellen somit ein gutes Beispiel für die Evolution einer Genfamilie durch Genduplikation und -diversifikation dar (Furie und Furie, 1988).

Die Gerinnungsenzyme werden als Prä-Proformen in der Leber synthetisiert und unter Abspaltung der Signalsequenz ins Plasma sezerniert. Dort zirkulieren sie als inaktive Vorstufen, bis sie im Verlauf einer Verletzung in die aktiven Enzyme umgewandelt werden.

Den N-Terminus der reifen Proenzyme bildet die so genannte Gla-Domäne. Diese wird Vitamin K -abhängig an 9-12 Glutamat-Resten in der Leber γ -carboxyliert. Die Gla-Domäne vermittelt die Anheftung der Proteine an die Membranoberfläche. Es folgt eine kurze Folge aromatischer Aminosäuren (*aromatic stack*, AS), abgelöst von zwei Domänen mit Homologie zum Zellrezeptor bindenden Modul des Wachstumshormons epidermal growth factor (EGF1 und EGF2). Diese Domänen bestimmen die spezifische Bindung der Enzyme an Kofaktor und makromolekulares Substrat und vermitteln ebenfalls Membrankontakt. C-terminal der EGF-Domänen befindet sich das Aktivierungspeptid, welches bei der Aktivierung der Zymogene ein- bis mehrfach gespalten wird. Die letzte und größte Domäne ist die katalytische Domäne (CD, *heavy chain*), eine trypsinartige Serinprotease (Tabelle II-2). Nach der Aktivierung bleiben *heavy chain* und *light chain* (Gla-AS-EGF1-EGF2) über eine Disulfidbrücke kovalent miteinander verknüpft.

Die katalytische Domäne der Gerinnungsproteasen hat eine hohe Homologie zu Trypsin und Chymotrypsin. Um die Enzyme besser untereinander vergleichen zu können wird daher im folgenden für die Reste der *heavy chain* die Chymotrypsinogen-Nummerierung verwendet. Die Reste der *light chain* werden durch das Kürzel „L“ gekennzeichnet.

Ein gemeinsames Merkmal der Gerinnungsenzyme der Faktor IX-Genfamilie besteht darin, dass die aktiven Enzyme erst in Gegenwart ihres Kofaktors volle Aktivität gegen ihr makromolekulares Substrat entwickeln (Tabelle II-3). Bemerkenswert ist weiterhin, dass die freien Enzyme eine höhere Aktivität gegen kurze synthetische Substrate als gegen ihr natürliches Substrat zeigen.

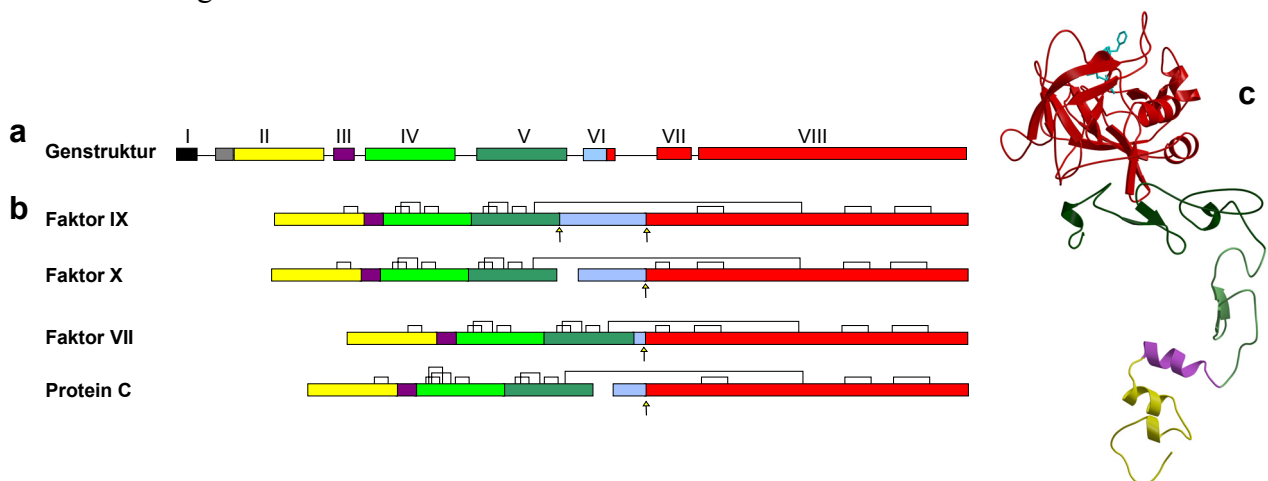


Abbildung II-2: Gen- und Domänenstruktur der Faktor IX-Genfamilie. a) Intron-/Exonstruktur. Die Exons sind als farbige Kästchen, die Introns als schwarze Linien dargestellt. Schwarz, Signalpeptid; grau, Propeptid; gelb, Gla-Domäne; lila, AS; hellgrün, EGF1; dunkelgrün, EGF2; blau, Aktivierungspeptid; rot, katalytische Domäne. b) Domänenaufbau der im Plasma zirkulierenden Zymogene. Die Domänen sind als farbige Kästchen mit aufgesetzten Disulfidbrücken dargestellt, die Spaltstellen für die Aktivierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. c) Kristallstruktur von PPACK-inhibiertem porcinem Faktor IXa. Die Farben der Domänen entsprechen denen der schematischen Darstellung, das aktive Zentrum ist durch den Inhibitor (blaue Stäbchen) gekennzeichnet.

Tabelle II-2: Überblick über die Domänenfunktionen in der Faktor IX-Genfamilie

Domäne	FVIIa	FIXa	FXa	APC
Gla	Membranbindung	Membranbindung	Membranbindung	Membranbindung
	TF2-Bindung ⁵	FVIIIa-C2-Bindung (?) ⁴	FVa-C2-Bindung (?)	
EGF1	TF1+2-Bindung ⁵	FVIIIa-A3-Bindung (?) ³	FVa-A3-Bindung (?)	APS Bindung
EGF2	TF1-Bindung ⁵	FVIIIa-A3-Bindung (?) ³	FVa-A3-Bindung (?)	APS Bindung
CD	Serinprotease	Serinprotease	Serinprotease	Serinprotease
	TF1-Bindung ⁵	FX Bindung	FVIIIa-A1-Bindung ²	FIXa/FXa-Bindung
	FIX/FX-Bindung	FVIIIa-A2-Bindung ^{1,3}	PT-Bindung	

1: Fay et al., 1999, 2: Lapan et al., 1997, 3: O'Brien et al., 1995, 4: Larson et al., 1996, 5: Banner et al., 1996.

Tabelle II-3: Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_m [$M^{-1}s^{-1}$]) von FIXa (Schwein), FXa (Rind) und FVIIa (Mensch) gegenüber natürlichen und synthetischen Substraten. Xase (IX): FIXa/FVIIIa/PL, PTase: FXa/FVa/PL, Xase (VII): FVIIa/TF/PL.

Substrat	FIXa	Xase (IX)	FXa	PTase	FVIIa	Xase (VII)
natürlich	100 ¹	280000000 ¹	130 ³	26000000 ³	0.94 ⁴	8250000 ⁴
synthetisch	500 ²	500 ²	1000000 ²	1000000 ²	2500 ⁴	57300 ⁴

1: Duffy et al., 1992, 2: McRae et al., 1981, 3: Rosing et al., 1980, 4: Neuenschwander et al., 1994.

II.1.3 Bedeutung von Faktor IXa und Kontrolle seiner Aktivität

Faktor IX nimmt eine zentrale **Rolle** in der Gerinnungskaskade ein, da er die Schnittstelle zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg darstellt. Er wird auch dann noch vom TF/FVIIIa Komplex aktiviert, wenn die extrinsische Aktivierung von FX über TF/FVIIa bereits durch TFPI unterbunden wird. Außerdem wird FIX auch in der Rückkoppelungsschleife des intrinsischen Wegs via FXIa aktiviert. Der FIXa/FVIIIa Komplex stellt bereits nach kurzer Zeit die einzige FX-aktivierende Entität dar. Da FXa/FVa seinerseits das einzige Thrombin-aktivierende Enzym ist, hat ein Ausfall der FX-Aktivierung infolge von FIX- oder FVIII-Defizienz (Hämophilie B / A) gravierende Folgen für die Blutungsstillung und es kommt zur Ausprägung der Bluterkrankheit.

Da FIXa eine so zentrale Rolle einnimmt, ist von besonderer Bedeutung, dass das Enzym nur dann seine volle Aktivität entwickelt, wenn dies physiologisch erforderlich ist, da sonst die Gefahr der Thrombosebildung besteht.

Diese **Kontrolle** wird über verschiedene Mechanismen ausgeübt. Der offensichtlichste Schutz vor unplanmäßiger Aktivität besteht darin, dass das Enzym als Proform in Plasma zirkuliert und erst nach einer Verletzung aktiviert wird. Der bedeutendere Kontrollmechanismus besteht jedoch darin, dass das aktivierte Enzym alleine kaum Aktivität besitzt. Zur effizienten Katalyse der Aktivierung von FX ist die Bildung des Xase Komplexes mit dem aktivierten Kofaktor VIIIa auf negativ geladenen Plättchen- oder Endothelmembranen in Gegenwart von Ca^{2+} notwendig (siehe Tabelle II-3). Die Komplexbildung bewirkt eine Zunahme der Aktivität um das 3×10^6 -fache (Duffy et al., 1992). Dadurch wird sichergestellt, dass die Gerinnung erst dann voll einsetzen kann, wenn durch die anfängliche Bildung von FXa und Thrombin auch der Kofaktor VIIIa zur Verfügung steht und Plättchen aktiviert wurden.

Bemerkenswert ist auch die geringe katalytische Aktivität von FIXa und Xase gegenüber kleinen synthetischen Substraten. Im Gegensatz zu FVIIa und FXa besitzt FIXa/Xase quasi keine amidolytische Aktivität. Untersuchung einer Vielzahl von peptidischen Substraten zeigte weiterhin, dass FIXa/Xase keine Aktivität gegenüber synthetischen Substraten mit der

Spaltsequenz von FX, seinem natürlichen Substrat, besitzt (Castillo et al., 1983, Cho et al., 1984). Vielmehr weist FIXa/Xase eine Selektivität für die Aktivierungssequenz von Prothrombin, dem Substrat von FXa, auf. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass die makromolekulare Substraterkennung und -bindung nicht primär über das aktive Zentrum erfolgt, sondern andere Bereiche sowohl des Enzyms als auch des Kofaktors und Substrats involviert sein müssen (Brandstetter et al., 1995).

Diese Eigenschaften erschweren die Entwicklung von peptidischen Substraten für Diagnose und Forschung sowie das Design von *spezifischen* niedermolekularen Inhibitoren gegen FIXa als Antikoagulantien.

II.1.4 Regulation der Aktivität von Faktor Xa

FXa zeichnet sich wie FIXa dadurch aus, dass er erst durch Bindung des Kofaktors Va auf negativ geladenen Phospholipidmembranen in Gegenwart von Ca^{2+} in eine effiziente Prothrombinase überführt wird. Im Komplex ist die Aktivität gegenüber Prothrombin um das $2 \cdot 10^5$ -fache erhöht (Rosing et al., 1980).

Im Gegensatz zu FIXa ist FXa in der Lage, synthetische Substrate zu hydrolysieren (McRae et al., 1981). Die Reaktivität gegen peptidische Substrate wird durch die Bildung des PTase Komplexes nicht beeinflusst.

Die Spezifitätskonstante für das natürliche Substrat Prothrombin liegt beim freien FXa 10^4 -fach unter, im Komplex 20-fach über der Konstante für synthetische Substrate. Das makromolekulare Substrat alleine kann also nicht so effizient gespalten werden wie ein kurzes peptidisches Substrat. Es wird aber durch Interaktionen mit dem Kofaktor und Einschränkung der Freiheitsgrade durch gemeinsame Verankerung von Enzym und Substrat auf der Phospholipidmembran sehr effizient an das katalytische Zentrum herangeführt und umgesetzt.

II.1.5 Die Aktivität von Faktor VIIa wird auf vielen Ebenen reguliert

FVII(a) weist im Gegensatz zu FIX(a) und FX(a) eine Reihe von Besonderheiten auf.

Von den betrachteten Enzymen besitzt FVIIa in Lösung die niedrigste Aktivität gegen sein natürliches Substrat (FX). Die proteolytische Aktivität wird durch die Bindung an TF und PL in Gegenwart von Ca^{2+} 10^8 -fach erhöht. Die strukturellen Grundlagen für diese starke Aktivitätszunahme sind nach wie vor ungeklärt. Man nimmt an, dass die Konformation der katalytischen Domäne von FVIIa in Lösung zwischen einer aktiven und einer inaktiven Form schwankt (Higashi et al., 1994). In der inaktiven Konformation ist die Salzbrücke des N-terminalen Ile16 zum Asp194 nicht vorhanden und damit das katalytische Zentrum nicht vollständig ausgeprägt. Das Substrat müßte bei der Bindung zunächst das Enzym mittels *induced fit* in die aktive Form überführen. Daher ist die Substratbindung in dieser Konformation energetisch ungünstig (hoher K_m). Die Aktivierung durch TF ist vermutlich auf eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten der aktiven Konformation des Enzyms und damit eine Verringerung der Substratbindungsenergie zurückzuführen. Hierbei spielen neben der Insertion des N-Terminus eine Reihe kooperativer allosterischer Wechselwirkungen eine Rolle (vgl. z.B. Ruf et al., 2000). Die These der allosterischen Regulation von FVIIa wird durch die Tatsache bestärkt, dass nicht nur die Aktivität gegen das natürliche Substrat durch Kofaktor-Bindung erhöht wird, sondern dass anders als in FIXa und FXa auch die Hydrolyse peptidischer Substrate 20-fach beschleunigt wird. Der beobachtete Effekt kann somit nicht nur auf eine vergrößerte Interaktionsfläche der makromolekularen Reaktionspartner zurückgeführt werden, sondern muss mit einer Veränderung der Eigenschaften der katalytischen Domäne einhergehen. Doch auch die makromolekularen Wechselwirkungen zwischen Substrat, Kofaktor und

Enzym spielen eine große Rolle für die Regulation der Aktivität, was durch den großen Unterschied in der Aktivitätszunahme zwischen synthetischem und natürlichem Substrat verdeutlicht wird. Durch die Bindung an TF werden FVIIa und makromolekulares Substrat optimal für die Katalyse zueinander ausgerichtet, was mit dem kleinen Substrat aufgrund fehlender Interaktion mit dem Kofaktor nicht möglich ist.

Von besonderer Bedeutung für die Aktivitätssteigerung ist die TF-vermittelte Bindung von FVIIa an die Zellmembran (Neuenschwander et al., 1994). FVII(a) alleine hat eine recht geringe Affinität für Phospholipide, die K_d liegt mit $15 \mu\text{M}$ etwa 1000-fach über der Plasmakonzentration des Enzyms (500 ng/ml). Im Vergleich dazu entspricht die K_d für FX(a) mit $0,2 \mu\text{M}$ etwa seiner Plasmakonzentration (Neuenschwander et al., 1994). Die Substrate von FVIIa können demnach auch in ihrer inaktiven Form und ohne Kofaktor an die Membran binden, FVIIa als Initiator der Gerinnung hingegen erst, wenn auch TF präsent ist. FVIIa ist ohne TF also weder aktiv, noch kann es sich dort anreichern, wo die lokale Konzentration der Zymogene abwärts in der Kaskade, also seiner Substrate, am höchsten ist. Diese Absicherung ist besonders wichtig, da immer eine kleine Menge ($3,6 \text{ ng/ml}$, Morrissey et al., 1993) FVIIa im Plasma zirkuliert, um bei einer Verletzung die Gerinnung schnell einzuleiten.

II.2 Strukturelle Grundlagen der Aktivität von FIXa, FXa und FVIIa

II.2.1 Spezifitätsdeterminanten in Serinproteasen

Die chymotrypsinartigen Serinproteasen haben eine gemeinsame Architektur: Ihre Proteasedomäne besteht aus zwei Untereinheiten desselben Polypeptids, die jeweils ein sechssträngiges β -Faß bilden und zusätzlich über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Das aktive Zentrum und die makromolekulare Substraterkennungsregion befinden sich zwischen den beiden Subdomänen und werden von Resten beider Hälften gebildet (Lesk et al., 1996).

Die chymotrypsinartigen Serinproteasen werden anhand ihrer primären Substratspezifität unterteilt.

Für das zu spaltende Polypeptid gilt die Nomenklatur nach Schechter und Berger (1967): Der Rest unmittelbar N-terminal der zu spaltenden Bindung wird als P1-Rest bezeichnet, der vorausgehende Rest P2 usw. Analog dazu werden die Reste C-terminal der zu spaltenden Bindung mit P1', P2' usw. bezeichnet. Die Bindetaschen im Enzym, welche die Seitenketten der Reste aufnehmen, heißen S1, S2, ..., bzw. S1', S2',

Chymotrypsin spaltet bevorzugt Substrate nach einem aromatischen oder großen hydrophoben P1-Rest, während Trypsin in P1 Arginin oder Lysin bevorzugt (Stryer, 1988). Verantwortlich dafür ist die Architektur der *S1-Tasche* (*primäre Spezifitätstasche*) der Enzyme. In Trypsin und verwandten Serinproteasen, wie den Gerinnungsenzymen der Faktor IX-Genfamilie, befindet sich am Boden der S1-Tasche ein Aspartat-Rest (Asp189), dessen Seitenkette eine negative Ladung in die Tasche einbringt. Diese Seitenkette kann eine Salzbrücke mit einer P1-Arginin-Seitenkette ausbilden und so dessen Bindung stabilisieren. Außerdem befindet sich etwas weiter oberhalb in der S1-Tasche ein Serin (Ser190), dessen γ -Sauerstoff zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zur Arginin-Seitenkette ausbilden und auch die Bindung von Lysin-Seitenketten stabilisieren kann. Ist dieses Serin durch ein Alanin ersetzt, wie in FXa, so kann die Bindung von Lysin-Seitenketten nicht stabilisiert werden und die Selektivität der S1-Tasche zugunsten von Arginin-P1-Resten ist weiter erhöht (siehe auch IV.4.2 sowie Abbildung II-3).

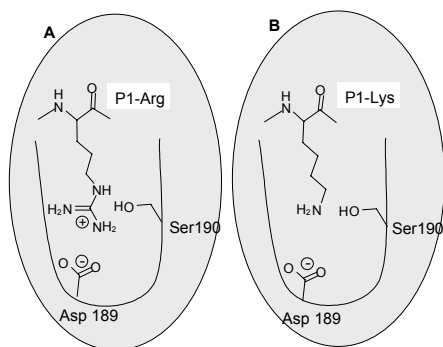


Abbildung II-3: Schematische Darstellung der Seitenketten von Asp189 und Ser190 in der S1-Tasche von trypsinartigen Serinproteasen. A, Arginin-Seitenkette in P1; B, Lysin-Seitenkette in P1.

Die Spezifitätsdeterminanten S2, S3 usw. spielen bei der Bestimmung der Spezifität verschiedener Enzyme eine besondere Rolle. Ihre Form und Bindeeigenschaften werden durch konservierte Sekundärstrukturelemente, vor allem aber durch die Größe, Orientierung und Zusammensetzung verschiedener variabler Oberflächenschleifen bestimmt.

Die gestrichelten Bindestellen S1', S2' usw. sind weniger gut charakterisiert. Dies liegt teilweise daran, dass sie experimentell nicht sehr gut zugänglich sind, obgleich in den letzten

Jahren einige Substrate und Methoden entwickelt wurden, um auch diese Bindestellen zu untersuchen (Schellenberger et al., 1993). Bei den Gerinnungsproteasen kommt hinzu, dass sie jeweils Serinproteasen als Substrat haben und einen N-Terminus mit der Sequenz IVGG oder VVGG erzeugen müssen. Somit kann die Spezifität für das jeweilige Substrat nicht durch die Bindung an die gestrichenen Bindestellen bestimmt werden, da die Substrate sich hier aus funktionellen Gründen meist nicht unterscheiden.

II.2.2 Spezifitätsdeterminanten innerhalb der Faktor IX-Genfamilie

Die Mitglieder der Faktor IX-Genfamilie weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Trotzdem unterscheiden sie sich gravierend hinsichtlich ihrer Reaktivität und Spezifität. Diese Unterschiede sind vor allem auf variable Oberflächenschleifen in der katalytischen Domäne zurückzuführen, welche die Substratbindungsregion flankieren und so Substrat- und Inhibitorspezifität bestimmen (Bode et al., 1997, Abbildung II-4). Auch Variationen in den EGF-Domänen spielen eine große Rolle bei der Erkennung, Bindung und richtigen Positionierung von makromolekularen Substraten und Kofaktoren.

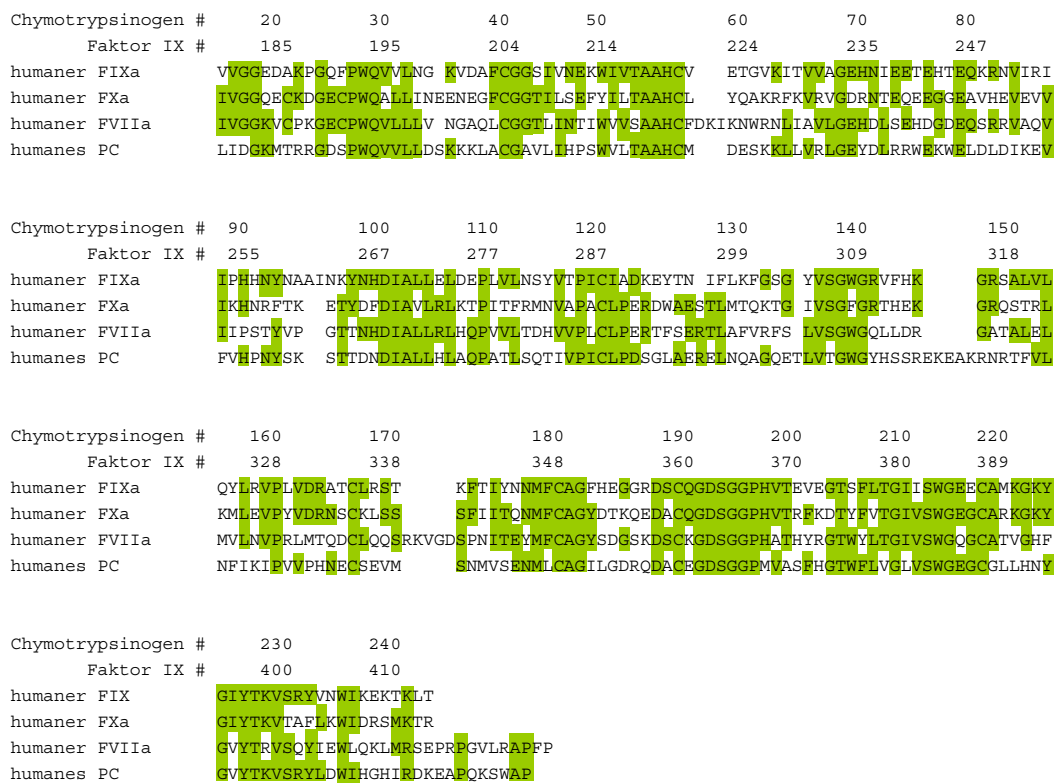


Abbildung II-4: Sequenzvergleich der katalytischen Domänen der Mitglieder der Faktor IX-Genfamilie. Die konservierten Bereiche sind grün hinterlegt. Die variablen Bereiche um die Reste 35, 60, 94-99, 140-150, 170-180 (Chymotrypsinogen-Nummerierung) flankieren die Substratbindungsregion und bestimmen die unterschiedliche Spezifität der Enzyme.

II.2.3 Strukturelle Grundlagen der unterschiedlichen Aktivität von FIXa und FXa

Die beiden Gerinnungsfaktoren FIXa und FXa weisen eine hohe strukturelle und funktionelle Homologie auf (40% Identität und 60% Ähnlichkeit über die gesamte Sequenz).

Beide Enzyme entwickeln volle Aktivität gegen ihr Substrat erst in der Gegenwart von Kofaktor und Phospholipidmembranen. Sie unterscheiden sich jedoch stark in ihren amidolytischen Eigenschaften. Obwohl beide Enzyme das gleiche Substratprofil besitzen, divergiert ihre Reaktivität gegen die bevorzugten synthetischen Substrate um drei bis vier Größenordnungen.

Ein Vergleich der bekannten Kristallstrukturen von FIXa (Brandstetter et al., 1995, Hopfner et al., 1999) und FXa (Padmanabhan et al., 1993, Brandstetter et al., 1996) zeigte einige Abweichungen in der Substratbindungsregion, die als Ursache für die unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften in Betracht kommen (vgl. Abbildung II-5).

Am Eingang zur S1-Tasche fällt das Augenmerk in FIXa auf den Rest **Glu219**. Dieser Rest ist in FIX streng als Glutamat konserviert, während alle anderen trypsinartigen Serinproteasen an dieser Position ein Glycin haben (Brandstetter et al., 1995). Die Hauptkette nimmt in diesem Bereich in PPACK-inhibiertem porcinem FIXa (Brandstetter et al., 1995) eine gespannte Konformation ein, welche nur für ein Glycin energetisch günstig ist. Stabilisiert wird diese Konformation lediglich durch eine Salzbrücke des Carboxylrests zu Arg148, welches seinerseits in FXa solvens exponiert ist. Es wäre vorstellbar, dass diese Konformation durch die Inhibitorbindung induziert wurde, die S1-Tasche im freien Enzym teilweise kollabiert ist und dadurch die Substrat- bzw. Inhibitorbindung erschwert wird. Ein Austausch des Glutamatrestes gegen ein Glycin sollte die Zugänglichkeit der S1-Tasche und somit die Aktivität des Enzyms erhöhen. Die entsprechende Mutation in humanem rekombinanten des-Gla-des-EGF1-FIXa (rF9a, siehe II.4) zeigte jedoch überraschenderweise leicht verschlechterte katalytische Eigenschaften (Hopfner, 1997). In der Kristallstruktur von PABA-inhibiertem rF9a besitzt Glu219 eine etwas günstigere Konformation, welche durch mehrere Wechselwirkungen stabilisiert wird, die ein Glycin an dieser Position nicht eingehen könnte (Hopfner et al., 1999). Die genaue Bedeutung dieses Restes für die Konformation der Spezifitätstasche von FIXa ist somit noch offen. Die umgekehrte Mutation (Gly219Glu) in FXa führte zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. In diesem Fall scheint also die Konformation der S1-Tasche gravierend beeinträchtigt zu sein.

Die S2-S4-Substratbindungsregion in FIXa und FXa wird von einer Oberflächenschleife, bestehend aus den Resten 94-99 (**99-Loop**) flankiert. Das konservierte Tyr99 bildet in FXa zusammen mit den Seitenketten der Reste Phe174 und Trp215 eine hydrophobe Tasche, welche große hydrophobe P4-Reste aufnehmen kann. Gleichzeitig wird durch die Tyr99-Seitenkette der Zugang zur S2-Tasche erschwert, was die Präferenz von FXa für Glycin-Reste in P2 erklärt (Brandstetter et al., 1996).

In FIXa hat der 99-Loop eine Insertion von 2 Resten. Die Hauptkette von Tyr99 nimmt zwar die gleiche Position wie in FXa ein, doch ist die Seitenkette verdreht. Dadurch wird die S2-Tasche nicht nur für die Seitenkette wie in FXa, sondern auch für die Hauptkette von P2-Resten blockiert. Außerdem ist der Zugang in die S4-Tasche für große Substratseitenketten behindert. Damit ist eine kanonische Substratbindung in FIXa mit einem entspannten 99-Loop nicht möglich. Diese Konformation des Loops wird vermutlich durch mehrere Wechselwirkungen stabilisiert, was die Substratbindung weiter erschwert (Hopfner et al., 1999 und IV.1). Durch Austausch des 99-Loops in rF9a gegen die entsprechende Sequenz von FXa konnte die amidolytische Aktivität des chimären Enzyms um etwa 2 Größenordnungen gesteigert werden. Umgekehrt bewirkte die Einführung des FIXa-99-Loops in humanen rekombinanten des-Gla-des-EGF1-FXa (rF10a, siehe II.4) eine drastische Abnahme der Aktivität, hauptsäch-

lich über eine 30-fache Zunahme von K_m (Hopfner, 1997). Der Einfluss des 99-Loops auf die Aktivität von FIXa beruht demnach tatsächlich auf einer Behinderung der Substratbindung. Es ist jedoch noch unklar, ob diese Eigenschaften primär von der Länge oder von der Sequenz des Loops herrühren. Diese Frage wurde in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

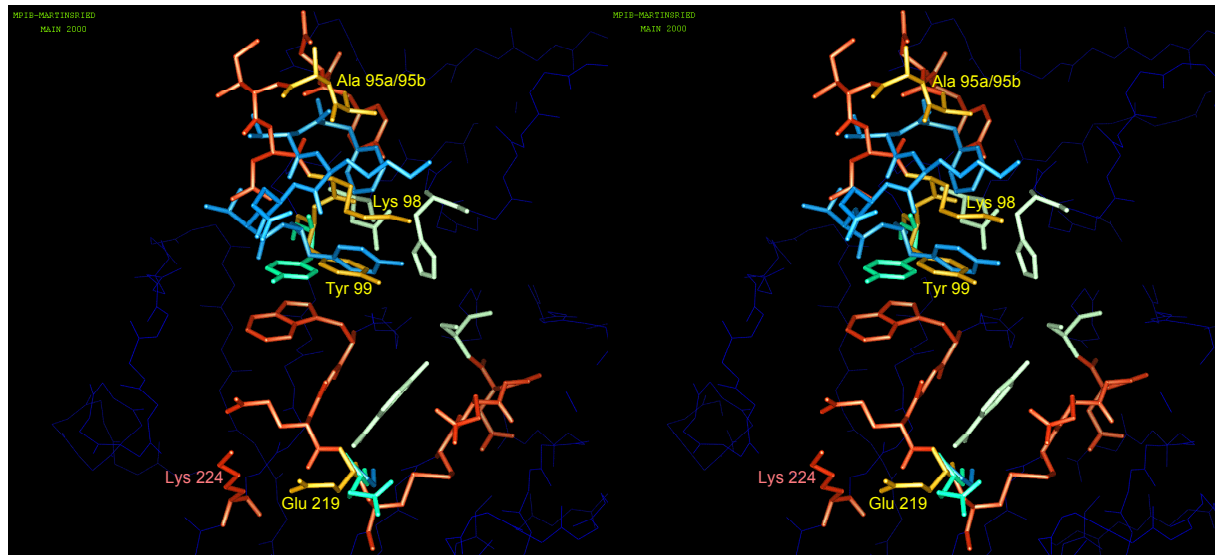


Abbildung II-5: Vergleich der Kristallstrukturen von humanem FIXa (rot) und FXa (blau) in der Substratbindungsregion. Die durch Mutagenese untersuchten Reste von FIXa sind gelb hervorgehoben. Zusätzlich sind die Reste der katalytischen Triade und der Inhibitor PABA in weiß sowie die Reste Tyr99 und Glu219 von porcinem FIXa grün eingezeichnet. Im Hintergrund ist die restliche Hauptkette von humanem FIXa in dunkelblau angedeutet.

II.3 Konsequenzen einer gestörten Hämostase

Die zuverlässige Funktion des hämostatischen Systems ist für den Organismus außerordentlich wichtig. Über- oder Unterfunktion einzelner Komponenten sind trotzdem häufig und verursachen eine Reihe von Krankheiten.

Sehr weit verbreitet sind **Hämophilie A und B**, die Faktor VIIIa- bzw. IXa-Defizienz (Bluterkrankheit). Etwa 0,1‰ der männlichen Bevölkerung ist von dieser X-chromosomal vererbten Krankheit betroffen, etwa ein Drittel aller Fälle entsteht durch spontane Neumutationen. Abhängig von der Art der Mutation kommt es zur Ausprägung von schwerer (60%), moderater (15%) oder milder (25%) Hämophilie.

Eine Überfunktion des Gerinnungssystems andererseits führt zu einer Reihe von Erkrankungen, deren bekannteste **Herzinfarkt, Schlaganfall und Thrombosen** sind. Diese Erkrankungen werden durch eine Reihe von Umweltfaktoren wie Stress, falsche Ernährung, Bewegungsmangel etc. begünstigt. In den Industrieländern kommt diesen Krankheiten eine wachsende Bedeutung zu und sie gehören zu den häufigsten Todesursachen.

In den letzten Jahren sind in der Behandlung und Prävention thrombotischer Erkrankungen große Fortschritte erzielt worden. Da der Markt sich nach wie vor in starkem Wachstum befindet, werden seitens der Pharmaindustrie große Anstrengungen zur Entwicklung oral verfügbarer Antikoagulantien oder Thrombolytika unternommen. Zur Entwicklung spezifisch wirkender Substanzen ist die genaue Kenntnis der funktionellen Eigenschaften und wechselseitigen Abhängigkeiten der einzelnen Komponenten der Gerinnungskaskade notwendig. Für das Verständnis dieser Eigenschaften und der Wirkung von Inhibitoren sind strukturelle Informationen, wie sie z.B. durch die Röntgenstrukturanalyse von Proteinkristallen gewonnen werden können, von herausragender Bedeutung.

II.4 Rekombinante Produktion von Gerinnungsproteasen

Für die Entwicklung effizienter und spezifischer niedermolekularer Inhibitoren gegen einzelne Mitglieder der Gerinnungskaskade sind Strukturinformationen von großer Bedeutung. Die exakte Kenntnis des Bindemodus erlaubt, die gefundenen Substanzen weiter zu optimieren.

Die Kristallisation von Gerinnungsfaktoren ist schwierig. Der Grund dafür liegt wahrscheinlich in der gestreckten und flexiblen Domänenanordnung, die eine enge Kristallpackung erschwert. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese sind in vielen der bekannten Kristallstrukturen von FIXa, FXa und FVIIa die Gla- und EGF1-Domäne flexibel oder ungeordnet. Aufgrund der schlechten Kristallisierbarkeit der Gerinnungsproteasen wird für die Kokristallisation mit Inhibitoren oft auf Trypsin als Kristallisationsmodell ausgewichen.

Zur Aufklärung des Funktionsmechanismus der Gerinnungsproteasen ist neben strukturellen Informationen auch die enzymatische Analyse ein wichtiges Werkzeug. Insbesondere die Überprüfung von aus der Struktur abgeleiteten Hypothesen über die Funktion einzelner Reste oder Oberflächenschleifen mittels Untersuchung gezielter Mutanten kann wichtige Einblicke in die Bedeutung verschiedener Strukturelemente gewähren.

Ein effizientes System für die schnelle rekombinante Herstellung ausreichender Mengen der gewünschten Varianten für Struktur-Funktionsstudien kann daher von großem Nutzen sein.

Die Gerinnungsfaktoren der Faktor IX-Genfamilie sowie andere chymotrypsinartige Serinproteasen wurden bereits in einer Reihe verschiedener Expressionssysteme rekombinant hergestellt (Tabelle II-4).

Tabelle II-4: Beispiele für die rekombinante Expression von Serinproteasen.

Protease	Expressionssystem	Referenz
Trypsinogen	<i>E. coli</i> (Periplasma)	Hedstrom et al., 1992
Chymotrypsinogen	Hefe (Sekretion)	Veneki et al., 1992
Prethrombin-2	<i>E. coli</i> (Zytoplasma)	DiBella et al., 1995
FX	CHO-Zellkultur (Sekretion)	Wolf et al., 1991
FIX	humane Nieren-Zellkultur (Sekretion)	Hamaguchi et al., 1991
FVII	baby hamster kidney cells (Sekretion)	Thim et al., 1988
Protein C	humane Nieren-Zellkultur (Sekretion)	Rezaie, 1996

Die Wahl des Expressionssystems richtet sich unter anderem danach, für welche Anwendung das Protein hergestellt werden soll.

In Prokaryonten (vor allem *E. coli*) lassen sich hohe Expressionsleistungen in kurzer Zeit und mit einem relativ geringen Kostenaufwand erzielen. Allerdings fehlen hier sämtliche posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Glykosylierungen. In Hefen (*S. cerevisia*) lassen sich ebenfalls hohe Expressionsleistungen erzielen, allerdings kommt es hier häufig zur Überglykosylierung sekretierter Proteine. Korrekt modifizierte und prozessierte Proteine höherer Organismen lassen sich daher meistens nur durch Expression in den entsprechenden Zellsystemen herstellen, was jedoch mit einem relativ großen Kosten- und Zeitaufwand bei geringen Ausbeuten verbunden ist.

Für den therapeutischen Einsatz rekombinanter Gerinnungsenzyme sowie zum Studium des physiologischen Komplexes aus Enzym, Kofaktor, Membran und makromolekularem Substrat ist es wichtig, dass alle Modifikationen, insbesondere die γ -Carboxylierung der Gluta-

matreste in der N-terminalen Domäne, vorhanden sind. Für diese Anwendungen ist es daher notwendig, aus Zellkulturen oder Blutplasma gewonnene Enzyme einzusetzen.

Untersucht man jedoch die Eigenschaften der Enzyme in Lösung und ohne Kofaktor, so ist die membranbindende Gla-Domäne nicht unbedingt erforderlich (Neuenschwander et al., 1994). Für eine Betrachtung der amidolytischen Eigenschaften und für das Studium der Inhibitorbindung an das aktive Zentrum ist es sogar ausreichend, lediglich die katalytische Domäne zu betrachten (Hopfner, 1997).

Die katalytische Domäne hat in den Enzymen der Faktor IX-Genfamilie einen engen Kontakt mit der EGF2-Domäne. Beide Domänen bilden zusammen den globulären „Kopf“ des Enzyms (vgl. Abbildung II-2). Weder katalytische- noch EGF2-Domäne sind im nativen Enzym modifiziert. Lediglich das Aktivierungspeptid von FIX und FX ist glykosyliert, wird aber bei der Aktivierung herausgespalten, sodass der „Kopf“ des aktiven Enzyms ohne Modifikationen bleibt.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde in unserer Arbeitsgruppe für Kristallisations- und Inhibitorstudien ein System für die rekombinante Herstellung von des-Gla-des-EGF1-Formen von FIX und FX in *E. coli* etabliert (rF9, rF10; Hopfner, 1997, siehe Abbildung II-6). Diese verkürzten Formen sollten für Struktur-Funktionsstudien in amidolytischen Assays geeignet sein und darüber hinaus verbesserte Kristallisationseigenschaften haben, da die flexiblen, gestreckten Domänen nicht mehr vorhanden sind.

Die Herstellung der verkürzten Enzyme ist im Kapitel „Material und Methoden“ eingehend beschrieben.

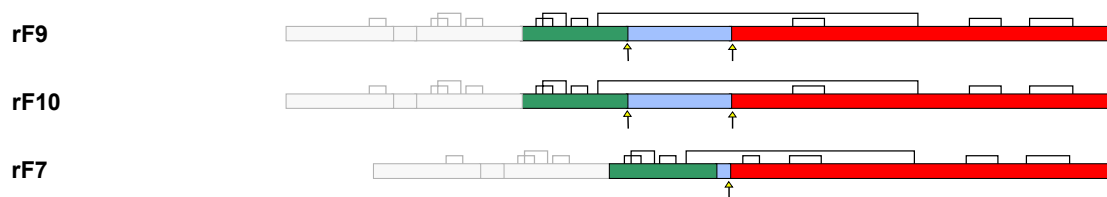


Abbildung II-6: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von des-Gla-des-EGF1-Faktor IX, X und VII (rF9, rF10, rF7). Die Domänen sind als farbige Kästchen mit aufgesetzten Disulfidbrücken dargestellt, die Spaltstellen für die Aktivierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. Rot, katalytische Domäne; blau, Aktivierungspeptid; grün, EGF2; grau, deletierte Domänen.

II.4.1 Kristallisationsmodell für Faktor X: rXYa

Faktor Xa steht vielerorts im Fokus für die Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Blutgerinnung. Wie oben bereits ausgeführt, sind für das effiziente Inhibitor-Design Strukturinformationen von großem Wert. Um trotz der Limitationen in der Kristallisierbarkeit von FXa schnell zu Strukturinformationen zu gelangen, werden FXa Inhibitoren häufig mit Trypsin kokristallisiert. Diese Strukturen geben zwar einen Anhaltspunkt für die Bindungsweise der Inhibitoren, aufgrund der Unterschiede in der Substratbindungsregion beider Enzyme können diese Daten jedoch nur unter Vorbehalt verwendet werden.

Neben der Strategie, die Kristallisierbarkeit von Gerinnungsfaktoren durch die Herstellung verkürzter Varianten zu erhöhen, wurde daher auch der Ansatz verfolgt, die guten Kristallisationseigenschaften von Trypsin mit den Substratbindungseigenschaften von Faktor Xa zu verbinden (Hopfner et al., 1998).

Im Gegensatz zu den Gerinnungsfaktoren besteht Trypsin lediglich aus der Serinproteinasedomäne. Der erste Schritt, die Kristallisationseigenschaften von Trypsin auf FXa zu übertragen, besteht darin, sich auf die katalytische Domäne von FXa zu beschränken, um ein Molekül vergleichbarer Größe und Konformation zu haben. Allerdings steht die C-terminale Subdomäne der katalytischen Domäne von FXa in engem Kontakt mit der EGF2-Domäne, ist somit im Gegensatz zum Trypsin-Äquivalent nicht solvens exponiert und hat eine hydrophobe Oberfläche.

Die Kristallisierbarkeit von Proteinen wird stark von ihren Oberflächeneigenschaften bestimmt. Um die katalytische Domäne von FXa an die Oberfläche von Trypsin anzugleichen und sowohl die Löslichkeit der Domäne als auch deren Kristallisierbarkeit zu verbessern wurde ein chimäres Enzym hergestellt. Diese Chimäre, genannt rXYa, besteht aus der N-terminalen Subdomäne von FXa und der C-terminalen Subdomäne von Trypsin (Hopfner et al., 1998). In Abbildung II-7 ist die Sequenz und ein Überblick über die Struktur der Chimäre dargestellt. Das aktive Zentrum der Chimäre wird von Resten beider Subdomänen gebildet. Dies spiegelt sich in den katalytischen Eigenschaften von rXYa wieder, welche zwischen denen von Trypsin und FXa liegen (vgl. IV.4.2.1). Die Kristallstruktur von PPACK-inhibiertem rXYa zeigte, dass die Konformation der Subdomänen denen der Ausgangsenzyme entspricht. Somit stellt rXYa ein verbessertes Kristallisationsmodell für FXa-Inhibitoren dar.

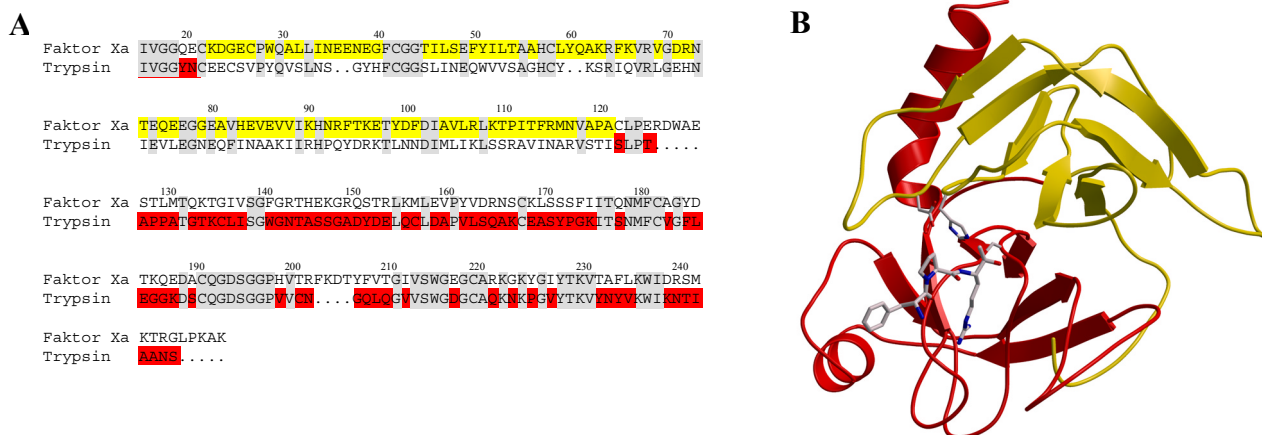


Abbildung II-7: Die Chimäre rXYa. A) Sequenz. Bereiche, welche von Faktor Xa stammen, sind gelb, diejenigen von Trypsin rot und konservierte Reste sind grau hinterlegt. B) Struktur. Die N-terminale Subdomäne, welche von Faktor Xa stammt, ist gelb eingefärbt, die C-terminale Subdomäne von Trypsin rot. Die Reste der katalytischen Triade und der gebundene PPACK-Inhibitor sind in Stick-Repräsentation dargestellt.

II.4.2 Inclusion bodies

Die starke Überexpression von sowohl heterologen als auch autologen Proteinen in *E. coli* resultiert in vielen Fällen, so auch bei der Expression von rF9, rF10, rXY und rTrypsin, in unlöslichen intrazellulären Aggregaten, den so genannten Einschlusskörpern (inclusion bodies, IBs). Der Grund dafür liegt darin, dass die Proteine schneller gebildet werden als sie sich in die richtige Konformation falten können. Die intrazelluläre Konzentration an nicht gefaltetem Protein ist dann stark erhöht und die Proteine präzipitieren. Der Anteil an löslichem Produkt kann durch Verlangsamung der Expressionsrate (Nährstoffmangel, niedrige Wachstumstemperatur, ...) erhöht werden. Insbesondere bei normalerweise extrazellulären Proteinen wie z.B. den Gerinnungsfaktoren ist dies jedoch nicht ausreichend, da hier für die richtige Konformation eine korrekte Disulfidverbrückung notwendig ist. Disulfidbrücken werden im

reduzierenden Cytosol nur sehr langsam gebildet (Derman et al., 1993), sodass sich große Mengen ungefalteter Proteins im Cytosol ansammeln und ausfallen.

II.4.3 Renaturierung von Inclusion Bodies

Die grundlegende Entdeckung, dass denaturierte Ribonuclease A in Abwesenheit zellulärer Faktoren in ihre aktive Konformation gebracht werden kann, hat gezeigt, dass die gesamte Information für die richtige Faltung eines Proteins bereits in seiner primären Aminosäuresequenz vorhanden ist (Afinsen, 1973), wenngleich die Faltung *in vivo* durch eine Vielzahl von Enzymen beschleunigt wird (Schwarz et al., 1996). Seither wurde eine Reihe effizienter Methoden zur *in vitro* Naturierung falsch gefalteter Proteine entwickelt (Rudolph et al., 1996).

Wie bei der rekombinanten Überexpression so konkurrieren auch bei der *in vitro* Naturierung falsche Faltung und Aggregation mit der Ausbildung der korrekten Konformation. Aggregation kann entweder durch nichtspezifische hydrophobe Wechselwirkungen ungefalteter Polypeptidketten oder durch Interaktion von Faltungsintermediaten verursacht werden (Abbildung II-8). Die Aggregationsprozesse folgen Kinetiken höherer Ordnung, während die richtige Faltung im Allgemeinen eine Reaktion erster Ordnung ist. Somit wird die Ausbeute an richtig gefaltetem Protein stark durch die Konzentration an ungefaltetem Protein bestimmt und nimmt oberhalb von etwa 10-50 µg/ml stark ab. Höhere Ausbeuten richtig gefalteten Proteins können jedoch durch wiederholte Zugabe von denaturiertem Protein in den Renaturierungspuffer erzielt werden, da bereits richtig gefaltetes Protein aus dem Gleichgewicht entfernt ist und in Lösung bleibt (Rudolph et al., 1996).

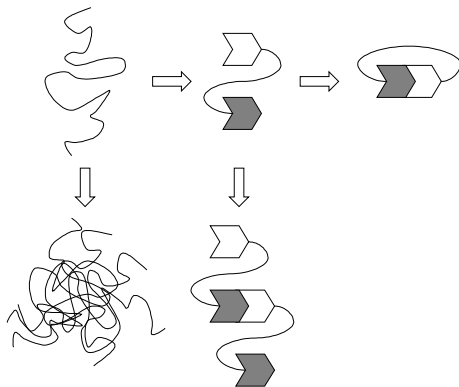


Abbildung II-8: Konkurrierende Reaktionen bei der Faltung von Polypeptidketten: Horizontal dargestellt sind die Reaktionsschritte, die einer Kinetik erster Ordnung folgen und zum korrekt gefalteten Produkt führen; vertikal die konkurrierenden Reaktionen höherer Ordnung, die zur Bildung unlöslicher Aggregate führen (nach Rudolph, 1996).

Die Faltung wird bei den meisten sekretorischen Proteinen dadurch erschwert, dass sie im nativen Zustand eine Reihe von Disulfidbrücken besitzen. Die Anzahl möglicher Kombinationen nimmt mit der Anzahl der Cysteinreste exponentiell zu. So ist z.B. bei einem Protein mit 16 Cysteinresten, wie rF10, nur eine von $2 \cdot 10^6$ Kombinationen richtig. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wird allerdings durch die unterschiedlichen freien Energien der verschiedenen Kombinationen beeinflusst, sodass nicht alle Varianten mit gleicher Häufigkeit entstehen. Durch Verwendung niedermolekularer Thiolverbindungen in oxidiert und reduzierter Form als Katalysatoren für die Ausbildung der Disulfidbrücken wird bei leicht alkalischem pH-Wert ein *oxido-shuffling* ermöglicht, bei dem energetisch ungünstige Disulfidbrücken immer wieder reduziert werden, solange bis die Cysteine den „richtigen“ Partner gefunden haben und in einem Energieminimum bleiben.

Ein weiteres Problem bei der Renaturierung besteht oft in der geringen Löslichkeit der denaturierten Polypeptidkette. Derivatisierung der Cysteine durch Ausbildung gemischter Disul-

fide mit Glutathion vor der Renaturierung führt eine Reihe von Ladungen in das Polypeptid ein und verhindert so das Ausfallen des Proteins in frühen Stadien der Naturierung. Die Ausbildung der Disulfidbrücken wird durch Zugabe katalytischer Mengen eines reduzierten Thiols in den Renaturierungspuffer ermöglicht.

Einige Beispiele für weitere Parameter, die den Erfolg der Rückfaltung beeinflussen können, sind in Tabelle II-5 aufgelistet.

Tabelle II-5: Parameter für die Renaturierung von inclusion body Protein

physikalische Parameter	nichtdenaturierende Mengen chaotroper Substanzen	Salze	nichtionische und zwitterionische Detergenzien	Liganden
	<i>Konkurrenz mit falschen intermolekularen Wechselwirkungen</i>	<i>Schutz von Zwischenprodukten</i>	<i>Schutz von Zwischenprodukten</i>	<i>Stabilisierung der nativen Struktur</i>
Proteinkonzentration	> 0,5 M L-Arginin	NaCl	0,06 mg/ml Laurylmaltosid	Metallionen
pH ≠ pI	> 0,5 M L-Lysin	(NH ₄) ₂ SO ₄	33 mM Chaps	Kofaktoren
Temperatur	> 0,4 M Tris	Na ₂ SO ₄	Glycerin	prothetische Gruppen
Ionenstärke	> 0,4 M Triethanolamin		Sucrose	
Redoxpotential	0-3 M GdmCl		Maltose	
Zeit	alkyl-Harnstoff Karbonsäureamide		PEG Ethylenglycol gemischte Mizellen aus Detergenzien und Phospholipiden	

II.5 Kristallographie

II.5.1 Kristallstrukturanalyse

Zur Bestimmung der Struktur von Makromolekülen bei atomarer Auflösung werden routinemäßig zwei Methoden verwendet: nukleare magnetische Resonanz (NMR)-Spektroskopie und Beugung von Röntgenstrahlung an Kristallen.

Für die NMR-Spektroskopie sind keine Kristalle nötig und sie kann außerdem Informationen über die Dynamik von Makromolekülen liefern. Allerdings ist ihre Anwendung auf Moleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 35 kDa beschränkt. Darüber hinaus ist für die NMR-Spektroskopie eine recht aufwendige und teure Probenvorbereitung (^{13}C , ^{15}N -Markierung der Proteine) notwendig. Aus diesen Gründen ist die Methode der Wahl für die Strukturbestimmung der meisten Proteine die Röntgenstrukturanalyse.

Seit den Pionierarbeiten von Perutz und Kendrew an Hämoglobin und Myoglobin hat die Zahl der durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Proteinstrukturen beständig zugenommen. Insbesondere die Weiterentwicklung von Hard- und Software zur Auswertung der Daten hat diese Entwicklung in den letzten Jahren dramatisch beschleunigt. Durch die Kombination von molekularbiologischen Techniken mit der Strukturaufklärung können einerseits große Mengen der gewünschten Proteine hergestellt werden, andererseits auch wichtige Einblicke in Struktur- Funktionszusammenhänge gewonnen werden.

Im Folgenden soll das Prinzip der Röntgenstrukturanalyse kurz erläutert werden, für eine detaillierte Beschreibung sei auf die entsprechenden Lehrbücher verwiesen (z.B. Drenth, 1994, Massa, 1996).

II.5.1.1 Kristallisation von Proteinen

Der entscheidende Schritt zur Röntgenstrukturanalyse von Proteinen besteht darin, Kristalle von ausreichender Größe und Qualität zu erhalten. Die Kristallisation von Proteinen ist nach wie vor ein im Detail weitgehend unverstandener Prozeß.

Die Kristallisation ist im Prinzip eine geordnete Präzipitation des Proteins. Diese wird erreicht, indem die Proteinlösung langsam zur Übersättigung gebracht wird. Dies kann durch Zugabe von Salz (Aussalzen) oder Polyethylenglycol erreicht werden. Es gibt verschiedene Verfahren, um zur Übersättigung zu gelangen, am häufigsten verwendet wird die Dampfdiffusionsmethode (Mc Pherson, 1976). Hierbei wird das Protein mit einem Fällungsmittel versetzt und in eine Umgebung gebracht, in der sich über die Dampfphase ein Gleichgewicht mit einer höher konzentrierten Lösung einstellt. Dadurch wird der Proteintropfen langsam aufkonzentriert.

Die Kristallisation eines Proteins hängt von vielen Parametern ab: Proteinkonzentration, Art und Konzentration des Fällungsmittels, pH-Wert, Temperatur und verschiedene Additive sind nur einige dieser Faktoren. Ein statistischer Ansatz für die Suche nach geeigneten Bedingungen besteht in einem faktoriellen Screen (Carter und Carter, 1979).

II.5.1.2 Kristalle

Kristalle sind aus einer regelmäßig wiederholten Anordnung von einzelnen Einheiten (Atome oder Makromoleküle), den Einheitszellen aufgebaut. Die Einheitszellen sind durch die Länge ihrer drei Achsen a , b und c und die eingeschlossenen Winkel α , β und γ charakterisiert. Weist der Kristall eine Symmetrie auf, so liegen die einzelnen Einheiten (asymmetrische Einheiten) gemäß den Symmetrieoperationen mehrfach in der Einheitszelle vor. Die Anzahl der Moleküle in der Einheitszelle muss dabei nicht mit der Anzahl der asymmetrischen Einheiten übereinstimmen, es können auch mehrere Moleküle in einer asymmetrischen Einheit vorliegen.

II.5.1.3 Beugung von Röntgenstrahlen

Bestrahlt man ein Atom mit Röntgenstrahlen, so führt das oszillierende elektromagnetische Feld der Röntgenstrahlen zu Schwingungen der Elektronen im Atom. Die oszillierenden Elektronen senden nun mit einer Phasenverschiebung von 180° ebenfalls Strahlung derselben Wellenlänge aus (*kohärente Streuung*). Die Streuung an Atomen ist abhängig von der Zahl und Position der Elektronen im Atom und wird durch den *atomaren Formfaktor* $f(\mathbf{S})$ beschrieben.

$$f(\mathbf{S}) = \int_{\mathbf{r}} \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{r}$$

$\rho(\mathbf{r})$ beschreibt hier die Elektronenwolke am Ort \mathbf{r} , \mathbf{S} den Differenzvektor zwischen einfallendem und gestreutem Strahl.

Die Streuung an einer Einheitszelle des Kristalls ergibt sich aus dem Streubeitrag aller Atome in der Einheitszelle und wird durch den *Strukturfaktor* $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ beschrieben, bei dem über alle Atome i summiert wird.

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \sum_i f_i \exp(2\pi i \mathbf{r}_i \cdot \mathbf{S})$$

Die Summe aller von den Einheitszellen in einem Kristall gestreuten Wellen ergibt die Welle, die vom gesamten Kristall gestreut wird. Eine Einheitszelle an der Kristallposition $\mathbf{r} = u\mathbf{a} + v\mathbf{b} + w\mathbf{c}$ (u, v, w ganze Zahlen, $\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c}$ Kristallvektoren) hat den Streubeitrag

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) \times \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S})$$

Der Kristall hat somit den Streubeitrag

$$\mathbf{K}(\mathbf{S}) = \mathbf{F}(\mathbf{S}) \times \sum_u \exp(2\pi i u \mathbf{a} \cdot \mathbf{S}) \times \sum_v \exp(2\pi i v \mathbf{b} \cdot \mathbf{S}) \times \sum_w \exp(2\pi i w \mathbf{c} \cdot \mathbf{S})$$

Die einzelnen Streubeiträge löschen sich aufgrund der großen Zahl der Einheitszellen fast immer aus (Addition der Vektoren im Argand Diagramm), es sei denn, $\mathbf{a} \cdot \mathbf{S}$, $\mathbf{b} \cdot \mathbf{S}$, $\mathbf{c} \cdot \mathbf{S}$ sind ganze Zahlen, die *Millerindizes* h, k, l . Wenn diese *Lauebedingungen* erfüllt sind, streuen alle Einheitszellen in Phase, und die Amplitude der gestreuten Welle ist proportional zum Strukturfaktor $\mathbf{F}(\mathbf{S})$ und der Anzahl der Einheitszellen im Kristall.

Die Streuung an einem Kristall verhält sich so, als ob der Strahl an den Gitterebenen des Kristalls reflektiert würde. Diese Gitterebenen können mit den Millerindizes aus den Lauebedingungen beschrieben werden, der Strahl wird von der Ebene (hkl) reflektiert. Daraus ergibt sich das Braggsche Gesetz

$$2d \sin \theta = \lambda$$

wobei λ die Wellenlänge des einfallenden Strahls, θ der Reflexionswinkel an der Gitterebene und d der rechtwinklige Abstand der Gitterebenen voneinander sind.

Die Millerindizes hkl bilden das so genannte *reziproke Gitter*. Dabei entspricht ein Gitterpunkt hkl im reziproken Gitter einer Schar von Gitterebenen im realen Gitter mit Indizes hkl und umgekehrt. Der Vektor hkl im reziproken Gitter hat die Länge $1/d_{hkl}$, wobei d_{hkl} der Abstand der Gitterebenen hkl im realen Gitter ist (daher der Name *reziprokes Gitter*). Es kann gezeigt werden, dass das reziproke Gitter dieselbe Symmetrie wie das Kristallgitter hat.

II.5.1.4 Berechnung der Elektronendichte

Anstatt über alle Atome in der Einheitszelle zu summieren, kann über die gesamte Elektronendichte in der Zelle integriert werden. Daraus ergibt sich für den Strukturfaktor

$$\mathbf{F}(\mathbf{S}) = \int_{cell} \rho(\mathbf{r}) \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{r}$$

Fouriertransformation ergibt

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_{cell} \mathbf{F}(\mathbf{S}) \exp(-2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) d\mathbf{S}$$

Mit den Lauebedingungen für $\mathbf{r}^* \mathbf{S}$ erhält man über die fraktionalen Koordinaten der Einheitszelle x, y, z ($\mathbf{r} = x\mathbf{a} + y\mathbf{b} + z\mathbf{c}$)

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

Mit $\mathbf{F} = |\mathbf{F}| \exp(i\alpha)$ erhält man schließlich

$$\rho(xyz) = \sum_{hkl} |F(hkl)| \exp(-2\pi i(hx + ky + lz) + i\alpha(hkl))$$

Die Elektronendichte in der Einheitszelle kann somit aus den Beiträgen der Strukturfaktoren, $|F|(hkl)$, und der Phasen $\alpha(hkl)$ berechnet werden.

Die Beiträge der Strukturfaktoren erhält man aus den gemessenen Intensitäten $I = a|F|^2$. a ist eine Konstante, die verschiedene Einflüsse wie Absorption, Datensammlung, Wellenlängenabhängigkeit der Streuung, Polarisation etc. beinhaltet. Die Phasen α können jedoch nicht direkt aus dem Streubild erhalten werden sondern müssen auf indirektem Weg erzeugt werden (Phasenproblem in der Kristallographie).

II.5.1.5 Lösung des Phasenproblems

Zur Lösung des Phasenproblems wurden vier Methoden entwickelt:

1. Isomorpher Ersatz: Schwermetallatome werden an die Proteinmoleküle im Kristall gebunden.
2. Multiple Anomale Dispersion (MAD): Messung von Streubildern bei verschiedenen Wellenlängen. Voraussetzungen sind Atome im Protein mit ausreichender anomaler Streuung (z.B. Zink oder Selen) und genau regulierbare Wellenlängen (Synchrotronstrahlung).
3. Molekularer Ersatz: Die Phasen werden näherungsweise von einer ähnlichen, bereits bekannten Struktur verwendet.
4. Direkte Methoden: Standardtechnik zur Phasenbestimmung in der Kleinmolekülkristallographie; für Proteine (noch) nicht anwendbar.

Die Strukturen der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe des molekularen Ersatzes bestimmt. Auf diese Methode soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

II.5.1.5.1 Molekularer Ersatz mit der Pattersonsuche

Die Methode des molekularen Ersatzes verwendet Phasen eines bekannten Moleküls als Suchmodell. Das Problem besteht darin, die Struktur des Suchmodells auf die unbekannte Struktur zu überlagern. Das Suchmodell wird in der Elementarzelle durch zwei Operationen optimal positioniert: Die Rotationssuche ermittelt die relative Orientierung der bekannten zur gesuchten Struktur, die Translationssuche die notwendige Verschiebung, um beide Moleküle zu überlagern.

Die Pattersonsuche faktorisiert das sechsdimensionale Suchproblem in zwei dreidimensionale Suchen. Sie verwendet als Grundlage die Pattersonfunktion (Autokorrelation der Elektronendichte).

$$P(\mathbf{u}) = \frac{1}{V} \sum_h |F(h)|^2 \cos(2\pi \mathbf{u} \cdot \mathbf{h}) = \int_{\mathbf{r}_1} \rho(\mathbf{r}_1) \times \rho(\mathbf{r}_1 + \mathbf{u}) d\mathbf{v}$$

\mathbf{h} beschreibt einen Vektor im reziproken Raum, \mathbf{u} einen Vektor im Pattersonraum. Zur Berechnung der Pattersonfunktion sind im Gegensatz zur Berechnung der Elektronendichte nicht der Betrag des Strukturfaktors, sondern sein Quadrat und somit nur die gemessenen Intensitäten, nicht jedoch die Phasenwinkel der Strukturfaktoren notwendig.

Als Autokorrelationsfunktion enthält die Pattersonfunktion nur Informationen über die relativen Abstände der Atome innerhalb einer Elementarzelle (relative Position der Atome). Die intramolekularen Vektoren sind nur von der Orientierung des Moleküls abhängig, während die intermolekularen Vektoren sowohl von der Orientierung als auch von der Position des Moleküls in der Elementarzelle abhängen. Daher werden zunächst in einer dreidimensionalen Rotationssuche die intramolekularen Vektoren beider Moleküle zur Deckung gebracht und anschließend die intermolekularen Vektoren beider Pattersonfunktionen in einer Translationssuche korreliert.

Für die Pattersonsuche ist eine hohe Homologie der unbekanntes Struktur zum Modell notwendig. In der vorliegenden Arbeit waren die Strukturen der betrachteten Moleküle bereits

verfügbar, sodass die Pattersonsuche ohne größere Modifikationen der Modellstrukturen durchgeführt werden konnte.

II.5.1.6 Modellbau und Verfeinerung

Bei der Verfeinerung des Modells zur Strukturlösung wurde der Energieterm

$$E = E_{geom} + W_a \sum_h \left| |F_{obs}(h)| - k |F_{calc}(h)| \right|^2$$

minimiert. Der Energieterm besteht aus einem geometrischen Energieterm E_{geom} des Modells und einem kristallographischen Energieterm. Der Parameter W_a skaliert beide Terme auf eine vergleichbare Größenordnung. Der geometrische Term wurde empirisch aus hochaufgelösten Strukturen kleiner Moleküle gewonnen und beinhaltet Terme für typische Bindungslängen, Bindungswinkel, van der Waals Wechselwirkungen etc. (Engh und Huber, 1991). Er sorgt somit für eine realistische Geometrie des Proteins. Dies ist nötig, weil die Anzahl der Messdaten zumeist nicht ausreicht, um alle Freiheitsgrade der Molekülgeometrie ausreichend festzulegen. Darüber hinaus sind gerade in der Anfangsphase der Verfeinerung bei typischen Auflösungen von 2-3 Å die Atompositionen noch nicht immer genau bestimmbar.

Für eine Kontrolle des Verlaufs der Verfeinerung wurden die Messdaten in einen Arbeitsdatensatz und einen Testdatensatz (5% der Daten bei rXYa S190A, 10% der Daten bei rF7a^{BA}) aufgeteilt. Die automatische Verfeinerung erfolgte nur mit dem Arbeitsdatensatz. Als Maß für die Verfeinerung wurde bei jedem Verfeinerungsschritt der R-Faktor berechnet.

$$R = \frac{\sum_h \left| |F_{obs}| - |F_{calc}| \right|}{\sum_h |F_{obs}|}$$

Die Berechnung des *freien* R-Faktors R_{free} (Brünger, 1992b) mit dem Testdatensatz erlaubt eine Aussage über die Qualität der Verfeinerung: Fällt R_{free} parallel mit dem R-Faktor, so ist der kristallographische Term ausreichend berücksichtigt und es wird nicht lediglich die Geometrie des Moleküls optimiert.

Es wurde zusätzlich zum Energieterm auch nach dem *maximum likelihood target* verfeinert. Hierbei wird bei der Verfeinerung jedes einzelnen Atoms berücksichtigt, dass die anderen Atome des Proteins keine starre Position einnehmen, sondern eine gewisse Beweglichkeit besitzen, sodass es nicht nur eine einzige minimierte Position für das jeweilige betrachtete Atom geben kann sondern diese abhängig vom Verhalten der umliegenden Atome ist.

II.6 Ziele und Inhalt der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollten die strukturellen Grundlagen für die geringe katalytische Aktivität von FIXa detaillierter charakterisiert, das Kristallisationsmodell für FIXa verbessert und ein Verfahren zur Herstellung von kristallisierbarem rF7a aus *E. coli* inclusion bodies etabliert werden.

II.6.1 Einfluss von Mutationen in der Substratbinderegion auf die Aktivität von rF9a

II.6.1.1 Untersuchung der S2-S4-Binderegion von rF9a

In den vorausgegangenen Arbeiten zur Analyse struktureller Aktivitätsdeterminanten von rF9a und rF10a waren wichtige Bereiche der Substraterkennungsregion beider Enzyme durch den Austausch ganzer Oberflächenschleifen charakterisiert worden (Hopfner et al., 1997). Einen besonders starken Effekt auf die Aktivität hatte der Austausch des 99-Loops zwischen beiden Enzymen gehabt. Wie oben bereits ausgeführt, konnte aus den Daten nicht geschlossen werden, ob dieser Effekt von der außergewöhnlichen Länge oder der spezifischen Sequenz des Loops herrührt. Aus diesem Grunde wurden in der vorliegenden Arbeit im 99-Loop von rF9a einzelne Reste durch Punktmutationen verändert, um ihren Einfluß auf die Reaktivität und Selektivität des Enzyms zu beleuchten. Ein Vergleich der Kristallstrukturen von PPACK- und PABA-inhibiertem FIXa mit derjenigen von FIXa lenkte das Augenmerk besonders auf die Reste Tyr99 und Lys98 und strukturell benachbarte Reste.

II.6.1.2 Untersuchung der S1-Tasche von rF9a

Neben der S2-S4-Binderegion wurde auch der Rest 219 am Eingang zur S1-Tasche näher untersucht. Wie oben ausgeführt, hatte der Austausch Glu219Gly keine Verbesserung sondern vielmehr eine Verschlechterung der Aktivität von rF9a zur Folge gehabt. Es sollte untersucht werden, wie groß der Einfluß der beobachteten Salzbrücke der Carboxylgruppe von Glu219 zum Lys224 auf die Stabilität der S1-Tasche ist. Aus diesem Grund wurde Glu219 durch ein Glutamin ersetzt und die amidolytischen Eigenschaften der Mutante untersucht.

Im Zuge der Experimente zur Verbesserung der FIXa-Kristallisationsmutante rXYa (siehe II.6.3) wurde weiterhin der Einfluß von Rest 190 auf die Spezifität für Arginin- vs. Lysin-Seitenketten in P1 charakterisiert.

II.6.2 Herstellung von rF7a aus *E. coli* inclusion bodies für die Kristallisation

Die Konzentration von FVII im Plasma ist mit 0,5mg/l um eine Größenordnung geringer als die Konzentration an FIX und FX. Die Aufreinigung des natürlichen Enzyms ist somit recht aufwendig und erfordert große Mengen an Plasma. Für biochemische Studien wird daher meist rekombinant in Säugerzellkulturen hergestellter FVII(a) verwendet. Dieses Enzym ist γ -carboxyliert und eignet sich auch zum Einsatz in der Substitutionstherapie bei Patienten mit FVII-Defizienz oder FVIIa-Antikörpern (Thim et al., 1988).

Die Kristallisation dieses Materials ist jedoch schwierig, weshalb lange Zeit, abgesehen von der Struktur von kovalent inhibiertem FVIIa im Komplex mit seinem Kofaktor TF (Banner et al., 1996), keine weitere Strukturinformation über FVIIa verfügbar war. Erst kürzlich konnten einige der Probleme bezüglich der Kristallisation von FVIIa durch Verwendung von Gla-Domäne-freiem rFVIIa gelöst werden (Kemball-Cook et al., 1999, Pike et al., 1999, Dennis et al., 2000). In all diesen Strukturen war jedoch das Enzym entweder kovalent durch Chloromethylketone oder durch Bindung eines Peptids inhibiert. Es fehlten Kristallformen, in denen die Bindung von nichtkovalenten Inhibitoren untersucht werden konnte. Von großem Interesse ist weiterhin die Struktur von uninhibiertem FVIIa, um Aufschluß über die Konformationsänderungen beim Übergang des aktivierten Enzyms von der inaktiven in die aktive Konformation zu erlangen.

Analog zu den oben beschriebenen verkürzten Varianten rF9a und rF10a wurde ein Verfahren zur Herstellung von Gla-EGF1-freiem FVIIa (rF7a) etabliert, um günstig ausreichende Mengen kristallisierbaren Enzyms gleichbleibender Qualität herstellen zu können. Die Kristallstruktur von rF7a im Komplex mit dem nichtkovalenten Inhibitor Benzamidin sowie die Struktur von rF7a mit einer unbesetzten S1-Tasche wurden gelöst.

II.6.3 Verbesserung des FXa-Kristallisationsmodells rXYa: Untersuchung der S1-Tasche

Die S1-Taschen der trypsinartigen Serinproteasen haben, wie in II.2.1 ausgeführt, eine sehr konservierte Struktur und nehmen vor allem Arginin- oder Lysinseitenketten auf. Die S1-Taschen von Trypsin, rXYa und FXa unterscheiden sich im Wesentlichen nur in der Seitenkette von Rest 190. Dieser ist ein Serin in Trypsin und rXYa und ein Alanin in FXa. Rest 190 hat eine große Bedeutung in der Stabilisierung von Lysinseitenketten (siehe II.2.1 und Evnin et al., 1990).

Der Einfluß der Seitenkette von Rest 190 auf die Selektivität für Lysin oder Arginin in verschiedenen Enzymen wurde untersucht, um zu überprüfen, ob durch Angleichung dieses Restes die Eigenschaften der S1-Tasche von rXYa denjenigen von FXa angepasst werden können.

Das mutierte Enzym rXYaS190A wurde im Komplex mit einem FXa-Inhibitor kristallisiert und die Struktur bestimmt.

III MATERIAL UND METHODEN

III.1 Material

III.1.1 Chemikalien und biochemische Reagenzien

Sämtliche Chemikalien waren, soweit nicht anders vermerkt, p. A. Qualität und wurden von folgenden Herstellern bezogen: Merck Eurolab GmbH (Darmstadt), Sigma Aldrich (Irvine, UK), Serva (Heidelberg).

Enzyme, Reaktionspuffer, Nukleotide, DNA- und Protein- Größenstandards, Substrate und andere biochemische Reagenzien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Roche Molecular Biochemicals (Mannheim) bezogen.

Chromatographiematerialien stammten von Amersham Pharmacia Biotech (Upsala, Schweden) und Merck Eurolab GmbH (Darmstadt).

Tabelle III-1: Bezugsquellen von Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Bezugsquelle
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Trypton	Difco, Detroit, USA
Bacto Yeast-Extrakt	Difco, Detroit, USA
S-2222	Chromogenix, Mölndal, Schweden
S-2444	Chromogenix, Mölndal, Schweden
S-2765	Chromogenix, Mölndal, Schweden
S-2251	Chromogenix, Mölndal, Schweden
S-2266	Chromogenix, Mölndal, Schweden
Schaf Anti-FVII PK IgG	Kordia, Leiden, NL
Broad Range MW Standard	Biorad, München
PPACK	Bachem Biochemica. AG, Heidelberg
PpuMI	New England Biolabs
SapI	New England Biolabs
Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt

III.1.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner GmbH (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen. Ultra- und Sterilfiltrationseinheiten stammten von den Firmen Millipore (Bedford, USA) und Pall Gelman Sciences (Ann Arbor, MI, USA). Kristallisationszubehör wurde von der Firma Hampton Research (Laguna Niguel, CA, USA) erworben.

Tabelle III-2: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Spritzen	B. Braun Melsungen AG
Slide-A-Lyzer Dialyserahmen	Pierce, Rockford, USA
Dialyseschläuche	Roth, Karlsruhe

Tabelle III-3: Geräte

Gerät	Bezugsquelle
ABI Prism System 373 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Weiterstadt
ABI Prism System 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Weiterstadt
GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Weiterstadt
Elektrophoresekammer (Agarosegele)	H. Hölzel Laborgeräte, Dorfen
Elektrophoresekammer (PAGE)	Biometra, Göttingen
Spektrophotometer Uvikon 933	Kontron Instruments, Mailand, Italien
Western Blot Elektrophorese Apparatur	Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
Biocad	Perceptive Biosystems Inc, Framington, MA, USA
Econo Column	Biorad, München
Dual Path Monitor UV-2	Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
Schreiber	Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
Schlauchpumpe	Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden
Schlauchpumpe	Abimed, Düsseldorf
Provario	Pall Filtron, Dreieich

III.1.3 Puffer und Lösungen

Im Folgenden sind die Puffer und Lösungen in der Reihenfolge ihres Erscheinens im Methodenteil aufgelistet.

TAE Puffer	40 mM 1 mM	Tris/Acetat (pH 8.0) EDTA
10 x DNA-Probenpuffer	4 % 50 %	Bromphenolblau Glycerin
5 x SDS-Probenpuffer	250 mM 5 % 43,5 % 10 mM 0,5 %	Tris (pH 6.8) SDS Glycerin EDTA Bromphenolblau
1 x SDS-Probenpuffer, reduzierend	20 % 100 mM	5 x SDS-Probenpuffer DTT
10 x Laufpuffer für PAGE	30 g 144 g (10 g	Tris Glycerin SDS) ad 1 l
Coomassie-Färbelösung	30 % (v/v) 10 % (v/v) 0,2 % (v/v)	Ethanol Essigsäure (konz.) Coomassie Brilliant Blue R-250
TBS	50 mM 150 mM	Tris/HCl (pH 7.4) NaCl

Brij-Puffer	6 % 1,5 M 60 mM	Brij NaCl EDTA pH 7.0 (NaOH)
Solubilisierungspuffer für IBs	6 M 20 mM 100 mM 150 mM 15 mM	Guanidinium-HCl EDTA Tris GSSG GSH pH 8.2
Renaturierungspuffer	0,5 M 50 mM 20 mM 1 mM 0,5 mM	Arginin Tris-HCl CaCl ₂ EDTA pH 8.5 bei 4°C Cystein x H ₂ O bei jedem Puls
Puffer 1 für SH-Gruppen-Bestimmung	80 mM 0,5 mg/ml 2 %	Na-Phosphat pH 8.0 EDTA (1,34 mM) SDS
Puffer 2 für SH-Gruppen-Bestimmung		wie Puffer 1, ohne SDS
DTNB-Lösung	40 mg/ml	DNTB in Puffer 2

III.1.4 Bakterienstamm

Für die Klonierung, Sequenzierung und Expression wurde der *E. coli* K12 Stamm UT5600 (Grodberg und Dumm, 1988) verwendet. Der Genotyp des Stamms ist: *F- ara proC14 leuB6 azi-6 lacyY1 tsx-67 entA403 trpE38 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1 Δ(ompT)*.

III.1.5 Nährmedien

LB (Luria Broth) Medium:	1,0 % (w/v)	Bacto-Trypton
	0,5 % (w/v)	Bacto Yeast Extrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
DYT Medium:	1,6 % (w/v)	Bacto-Trypton
	1,0 % (w/v)	Bacto Yeast Extrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl
Fermentations-Medium	5 % (w/v)	Springer-Hefe, salzfrei
	0,3 % (w/v)	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O
	0,005 % (v/v)	Synperonic AS
	0,3 % (w/v)	Glucose
	0,074 % (w/v)	MgSO ₄ x 7H ₂ O

Die Medien wurden durch 20-minütiges Autoklavieren bei 121°C und 2 bar sterilisiert. LB-Agar wurde durch Zugabe von 1,5% (w/v) Bacto-Agar vor dem Autoklavieren hergestellt. Die Zugabe von Ampicillin (100µg/ml) und Kanamycin (50µg/ml) erfolgte nach Abkühlen des Mediums auf max. 50°C.

III.1.6 Plasmide

III.1.6.1 PSA

Alle Klonierungen und Expressionen der rekombinanten Proteine wurden in einem pUC18 Derivat der Firma Roche Diagnostics GmbH durchgeführt (Kopetzki et al., 1993). Die Selektion erfolgt über Ampicillin Resistenz. Die Kontrollregion besteht aus einem T5-Promoter und zwei Bindestellen für den lac-Repressor. Die Expression wird über die IPTG induzierte Dissoziation des Repressors vom Operator eingeleitet und erfolgt über die zelleigene RNA-Polymerase.

III.1.6.2 pUBS520

Zur effizienten Unterdrückung der Expression während der Anzucht des Expressionsstamms wurde auf dem Helferplasmid pUBS520 weiterer *lacI^q* Repressor in die Zellen eingebracht (Brinkmann et al., 1989). Die Selektion erfolgt über Kanamycin.

III.1.7 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech, Ebersberg synthetisiert und RP bzw. HPSF gereinigt.

Tabelle III-4: Oligonukleotide zur Klonierung und Mutagenese von rF10 Varianten

Name	Sequenz	Spezifität	Verwendung
PX-N1	AAA AAA <u>GGC GCC</u> TGC CTG CCT CCC CG	5'	rf10 A190S
PX-C1	AAA AAA <u>GCT CTT CAA</u> GAA TCC TCC TGC TTG GTG TCG TAG CCG G	3'	rf10 A190S
PX-N2	AAA AAA <u>GCT CTT CTT</u> CTT GCC AGG GGG ACA GCG GGG G	5'	rf10 A190S
PX-C2	AAA AAA <u>GCT CAG CTA</u> ATT <u>CAG CTT</u> CAT TAC TTG GCC	3'	rf10 A190S

Tabelle III-5: Oligonukleotide zur Klonierung und Mutagenese von rTrypsin und XY Varianten

Name	Sequenz	Spezifität	Bemerkungen
PTRY-N1	AAA AAA <u>CCA GCC</u> ACT <u>GGC</u> ACG AAA TGC C	5'	Try S190A und XY S190A
PTRY-C1	AAA AAA <u>GCT CTT CAA</u> GCA TCC TTG CCT CCC TCA AGG AAG	3'	Try S190A und XY S190A
PTRY-N2	AAA AAA <u>GCT CTT CTG</u> CTT GTC AGG GTG ATT CTG GTG GCC	5'	Try S190A und XY S190A
PTRY-C1	AAA AAA <u>AAG CTT</u> CAT TAG CTA TTG GCA GCT ATG	3'	Try S190A und XY S190A

Tabelle III-6: Oligonukleotide zur Klonierung und Mutagenese von rF9 Varianten

Name	Sequenz	Spezifität	Verwendung
PIX-N1	AAA AAA <u>ATG CAT</u> TTT GTG GAG GCT CTA TCG TTA ATG AAA AAT G	5'	rf9 S190A
PIX-C1	AAA AAA <u>GGG TCC CCC</u> ACT ATC TCC TTG ACA TGC ATC TCT ACC TCC TTC ATG GAA G	3'	rf9 S190A
PIX-N2	AAA AAA <u>ACC AGG TCA</u> ATT CCC TTG GCA GGT AGT ACT GAA TGG TAA AGT TGA TGC ATT CTG	5'	rf9 S190A
PIX-N3	AAA AAA CTG AGG <u>GAT ATC GCT TAG</u> CAG AAA ACC AGA AGT CCT GTG AAC	5'	Außenprimer rf9-Mutanten
PIX-C2	CTA ATT <u>AAG CTT CAC</u> TAA GTG AGC TTT GTT TTT TCC TTA ATC CAG	3'	Außenprimer rf9-Mutanten
PIX-C2a	AAA AAA <u>AAG CTT CAT</u> TAA GTG AGC TTT GTT TTT TCC TTA ATC	3'	Außenprimer rf9-Mutanten
PIX-N4	AAA AAA <u>GCT CTT CAC</u> AGT GTG CAA TGA AAG GCA AAT ATG G	5'	rf9 E219Q
PIX-C3	AAA AAA <u>GCT CTT CAC</u> TGT TCA CCC CAG CTA ATA ATT CCA GTT AAG	3'	rf9 E219Q
PIX-N5	ATG TGA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT ACA ATG CAG CTA TTA ATA <u>CCT</u> ACA ACC ATG ACA TTG CCC TTC TGG	5'	rf9 K98T
PIX-N6	ATG TGA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT ACA ATG CAG CTA TTA ATA <u>AGC TGA</u> ACC ATG ACA TTG CCC TTC TGG AAC	5'	rf9 Y99L
PIX-C4	AAA AAA <u>GGG TCC CCC</u> AGC ATC TCC TTG ACA TGA ATC TCT ACC TCC	3'	rf9 S195A
PIX-N7	ATG TGA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT ACA ATG CAG CTA TTA ATA <u>TGT</u> ACA ACC ATG ACA TTG CCC TTC TGG	5'	rf9 K98M
PIX-N8	ATG TGA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT ACA ATG CAG CTA TTA <u>ATC GTT</u> ACA ACC ATG ACA TTG CCC TTC TGG	5'	rf9 K98R
PIX-N9	ATG TGA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT ACA ATG CAG CTA TTA ATA <u>AGG CTA</u> ACC ATG ACA TTG CCC TTC TGG AAC	5'	rf9 Y99A
PIX-N10	ATG TGA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT ACA ATG CAG CTA TTA ATA <u>AGA CCA</u> ACC ATG ACA TTG CCC TTC TGG AAC	5'	rf9 Y99T
PIX-N11	AAA AAA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT ACA AT.A TTA ATA AGT ACA ACC ATG ACA TTG CCC	5'	rf9 Δ A95a/95b
PIX-N12	AAA AAA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT <u>TCA</u> CCA AAG AAA CCT ACA ACC ATG AC	5'	rf9 Loop99(X) Y94F Y177T
PIX-N13	AAA AAA <u>TTC GAA</u> TTA TTC CTC ACC ACA ACT <u>TCA</u> ATG CAG CTA TTA ATA CCT ACA AC	5'	rf9 K98T Y94F Y177T
PIX-N14	AAA AAA <u>GCT CTT CCA</u> CCA ACA ACA TGT TCT GTG CTG GCT TC	5'	rf9 K98T Y94F Y177T
PIX-C5	AAA AAA <u>GCT CTT CTG</u> GTG ATG GTG AAC TTT GTA GAT CGA AGA C	3'	rf9 K98T Y94F Y177T

Tabelle III-7: Oligonukleotide zur Klonierung und Mutagenese von rF7 Varianten

Name	Sequenz	Spezifität	Verwendung
PVII-N1	AAA AAA <u>TCT AGA</u> AAA AAG AAA TGC CAG CAA ACC CCA AGG CCG AAC CAG CAG CAG CGG GGA GGC CCC	5'	rf7-10AP
PVII-C1	AAA AAA <u>CCA TGG</u> ACA CTC CCC TTT GGG GCA CAC CTT GCC CCC CAC AAT TCG GCC TTG GGG GTT GTC GCC CCT CTC AGG CTG	3'	rf7-10AP
PVII-N2	AAA AAA <u>GAA TTC</u> ATT AAA GAG <u>GIG</u> AAA TTA AAA <u>TGC</u> TGA TCT GTG TTA ACG <u>AAA</u> ACG GCG GCT GTG AGC AGT ACT	5'	Verkürzung des N-Terminus um 5 Reste
PVII-C2	AAA AAA <u>TCT AGA</u> ATA GGT ATT TTT CCA CAT GGA TAT TCA ACT GTG GG	3'	Verkürzung des N-Terminus um 5 Reste
PVII-N3	AAA AAA <u>GAA TTC</u> ATT AAA GAG GAG AAA TTA AA ATG GCT AAC GCT TTC CTG GAA GAA CTG CGT CCG GGC TCC CTG GAG AGG GAG	5'	rf7-Gla
PVII-C3	AAA AAA <u>AAG CTT</u> CAT TA GGG AAA TGG GGC TCG CAG GAG G	3'	rf7-Gla
PVII-N4	AAA AAA <u>GAA TTC</u> ATT AAA GAG GAG AAA TTA AA ATG GAC GGT GAC CAG TGT GCT TCC TCC CCG TGC CAG AAT GGG GGC TCC TGC	5'	rf7-EGF1
PVII-C4	AAA AAA <u>CCA TGG</u> ACA CTC CCC TTT GGG GCA CAC CTT GCC CCC CAC AAT CCT GGT GAG GTT GTT GTC GCC	3'	rf7-10EGF2
PVII-N5	AAA AAA <u>GAA TTC</u> ATT AAA GAG GAG AAA TTA <u>AAC</u> ATG GAT GTA ACA TGT AAC ATT AAG AAT GGC	5'	rf7-9EGF2
PVII-C5	AAA AAA <u>CCA TGG</u> ACA CTC CCC TTT GGG GCA CAC CTT GCC CCC CAC AAT CCG AGT GAA GTC ATT AAA TGA TTG GG	3'	rf7-9EGF2

Tabelle III-8: Sequenzierprimer

Name	Sequenz	Spezifität	Bemerkungen
psp-10N2	AAT TTA TTT GCT TTG TGA GCG G	5'	Promoterbereich pDS
psp-10C	CCG GCG GCA ACC GCG CG	3'	nach Stop in pDS
psp-10a-EGF	GCA GCC GAC CTG GAC CC	5'	rF10, EGF2
psp-10a	GGC GGT GCA CGA GGT GGA G	5'	rF10, CD
psp-10b	CAG GAG AAG GGC CGG CAG	5'	rF10, CD
psp-10ar	GGC GGT GGG CAG AGA GG	3'	rFXV, Übergang X-Y
Tryp-1	AGT CCC GCA TCC AGG TGA G	5'	Trypsin
Tryp-2	AGC TCT GGC GCC GAC TAC	5'	Trypsin
psp-9-1	CTA TGT AAA TTC TAC TGA AGC TG	5'	rF9, EGF2
psp-9-2	GTG ATT CGA ATT ATT CCT CAC C	5'	rF9, CD
psp-9-3	GAT TGT AAC TGC TGC CCA CTG	5'	rF9, CD
psp-7-1	GGG AGT GTC CAT GGC AGG	5'	rF7, CD
psp-7-2	CTG ACC ATG TGG TGC CCC	5'	rF7, CD
psp-7-3	CAG ATG GTG TTG ATC AGG G	3'	rF7, CD

III.2 Methoden

III.2.1 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Arbeiten wurden entsprechend Sambrook et al. (1989) durchgeführt und sind hier nicht im einzelnen aufgeführt.

III.2.1.1 Isolierung von DNA

III.2.1.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA für alle nachfolgenden Experimente (analytischer und präparativer Restriktionsverdau, PCR, Sequenzanalyse) wurde mittels des High Pure Plasmid Isolation Kit der Roche Molecular Biochemicals GmbH (Mannheim) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Bei dieser Methode folgt auf eine alkalische Lyse der Bakterienzellen (Birnboim *et al.*, 1979) und gleichzeitigem Abbau der zellulären RNA durch RNase A die Bindung der DNA unter Hochsalzbedingungen an ein Glasvlies. An dieser Oberfläche kann die DNA gewaschen und anschließend in Niedrigsalzpuffer oder Wasser frei von Salzen, Proteinen oder anderen zellulären Verunreinigungen eluiert werden. Typischerweise wurde die DNA aus 1,5ml LB ÜN-Kultur in 100µl Wasser mit einer Konzentration von 100ng/µl eluiert.

III.2.1.1.2 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung einzelner DNA-Fragmente, etwa nach einem Restriktionsverdau, wurden diese zunächst über Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt. Die gewünschten Banden wurden dann mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden) nach den Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel isoliert. Das Agarosegel wird zunächst solubilisiert, anschließend die DNA unter Hochsalzbedingungen an ein Silicalgel gebunden, gewaschen und in 10mM Tris, pH 8.5 eluiert.

III.2.1.2 Charakterisierung von DNA

III.2.1.2.1 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde im Agarosegel im Vergleich mit der Intensität der Banden des Größenstandards abgeschätzt oder photometrisch bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht 50µg/ml Plasmid-DNA, der Quotient OD_{260}/OD_{280} ist ein Maß für die Reinheit der DNA und beträgt 2 für reine DNA. Je niedriger der Quotient, desto größer ist die Verunreinigung mit Proteinen, die bei 280nm absorbieren.

III.2.1.2.2 Restriktionsanalyse

Durch Restriktionsverdau wurde der Klonierungserfolg bestimmt. Hierzu wurden typischerweise 0,5µg Plasmid-DNA mit 10U Enzym unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen für 1 Stunde inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt.

III.2.1.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA Fragmenten gemäß ihrer Größe erfolgte in 1% (w/v) Agarosegelen. Die Agarose wurde in 100ml TAE-Puffer aufgeköcht, bei etwa 60°C wurden 50µg Ethidiumbromid zugesetzt und die Lösung in eine horizontale Gelapparatur (8 x 12,5cm) gegossen. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftrag mit 10x Probenpuffer versetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde die Elektrophorese mit TAE als Elektrodenpuffer bei einer konstanten Spannung von 140V durchgeführt und anschließend die aufgetrennten DNA-Banden anhand ihrer Fluoreszenz durch das interkalierte Ethidiumbromid bei 254nm untersucht.

III.2.1.2.4 Sequenzierung

Alle neu hergestellten Konstrukte wurden einer Sequenzanalyse unterzogen. Die Sequenzierung erfolgte durch eine Variante der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977) über Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in einer cycle sequencing Reaktion. Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des Big Dye RR Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) nach den Angaben des Herstellers und unter Zugabe von 5% DMSO mit einem GeneAmp PCR System 2400 durchgeführt.

Der Reaktionsmix wurde durch Ethanolfällung (für ABI Prism 373) bzw. über QIAquick DyeEx Säulchen (für ABI Prism 310) aufgereinigt um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen und anschließend der Sequenzanalyse unterworfen.

III.2.1.3 Mutagenese von DNA

III.2.1.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Chain Reaction (PCR) wurde nach der Methode von Mullis und Faona (1987) durchgeführt.

Es wurden das PWO DNA Polymerase Kit und der PCR Nucleotide Mix der Firma Roche Molecular Biochemicals GmbH verwendet. Die Reaktion wurde in einem GeneAmp 2400 PCR System (Perkin Elmer, Weiterstadt) Gerät durchgeführt.

Typische Reaktionsbedingungen in einem 100µl-Ansatz waren wie folgt:

10 mM	Tris-HCl, pH 8.85
25 mM	KCl
5 mM	(NH ₄) ₂ SO ₄
2 mM	MgSO ₄
10 ng	Template Plasmid
1 µM	je Oligonukleotid
0,2 mM	dNTPs (N=A,T,G,C)
2,5 Units	Pwo DNA Polymerase

Die Reaktion lief nach folgendem Programm ab:

t	T	Anzahl Zyklen
5 min	94°C	1
30 sec	94°C	25
30 sec	60°C	
60 sec	72°C	
10 min	72°C	1

Die PCR Reaktionen wurden anschließend über das High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals) aufgereinigt und in 25µl EB (10mM Tris, pH 8.5, 1mM EDTA) eluiert.

III.2.1.3.2 PCR-Mutagenese

Alle Mutationen wurden durch Verwendung von Oligonukleotiden mit der gewünschten, veränderten Sequenz eingefügt. Zur einfachen Unterscheidung der neuen von den Ausgangskonstrukten wurden neben den gewünschten Mutationen der Proteinsequenz auch jeweils stille Mutationen eingeführt. Durch diese wurden Schnittstellen zerstört oder neu eingebaut, um schon vor der Sequenzierung einen ersten Hinweis auf die Effizienz der Klonierung zu erhalten.

Die beiden für eine PCR Reaktion benötigten Oligonukleotide waren typischerweise wie folgt aufgebaut (5' → 3' Richtung):

Oligo 1 (vorwärts)

- 6 A Überhang für bessere Leistung der Restriktionsenzyme
- singuläre Restriktionsschnittstelle zum Klonieren
- evtl. stille Mutation, um Kontrollschnittstelle zu erzeugen oder zu zerstören
- Sequenzbereich zwischen Schnittstelle(n) und Mutation
- Mutation
- zum Template homologer Bereich von 20-30 nt mit $T_m 72 \pm 4^\circ\text{C}$ (A/T $\equiv 2^\circ\text{C}$, G/C $\equiv 4^\circ\text{C}$)

Oligo 2 (rückwärts)

- 6 A Überhang
- singuläre Restriktionsschnittstelle zum Klonieren
- evtl. stille Mutation, um Kontrollschnittstelle zu erzeugen oder zu zerstören
- zum Template homologer Bereich von 20-30 nt mit $T_m 72 \pm 4^\circ\text{C}$.

War keine singuläre Restriktionsschnittstelle im Bereich der zu mutagenisierenden Region vorhanden, wurde ein Umweg über Einfügen einer *SapI* Restriktionsschnittstelle gewählt. *SapI* erzeugt überhängende Enden 3' seiner Erkennungssequenz und entfernt damit seine eigene Erkennungssequenz aus dem PCR-Produkt. Somit können komplementäre Enden in zwei PCR Produkten geschaffen werden, ohne Fremdsequenz im Produkt zu behalten. Die Mutagenese erfolgt hier über zwei PCR-Produkte, die an den Außenseiten über singuläre Schnittstellen in den Vektor eingefügt werden und im Bereich der Mutation über die *SapI* – Schnittstelle ligiert werden. In diesem Falle sahen die Oligonukleotide wie folgt aus:

Oligo 1 (vorwärts)

- 6 A Überhang
- singuläre Restriktionsschnittstelle zum Klonieren
- evtl. stille Mutation, um Kontrollschnittstelle zu erzeugen oder zu zerstören
- zum Template homologer Bereich von 20-30 nt mit $T_m 72 \pm 4^\circ\text{C}$

Oligo 2 (rückwärts)

- 6 A Überhang
- *SapI* Restriktionsschnittstelle
- Mutation
- zum Template homologer Bereich von 20-30 nt mit $T_m 72 \pm 4^\circ\text{C}$

Oligo 3 (vorwärts)

- 6 A Überhang
- *SapI* Restriktionsschnittstelle
- Mutation
- zum Template homologer Bereich von 20-30 nt mit $T_m 72 \pm 4^\circ\text{C}$

Oligo 4 (rückwärts)

- 6 A Überhang
- singuläre Restriktionsschnittstelle zum Klonieren
- evtl. stille Mutation, um Kontrollschnittstelle zu erzeugen oder zu zerstören
- zum Template homologer Bereich von 20-30 nt mit $T_m 72 \pm 4^\circ\text{C}$

In nachfolgenden Tabellen sind schematisch die für die einzelnen Konstrukte verwendeten Primer, Plasmide und Klonierungsstrategien dargestellt.




Tabelle III-9: Primer und Plasmide für die Herstellung von rF9-Mutanten

Plasmid	PCR	Oligo	Enzym	Template/ kloniert in
rF9 S190A		1. PIX-N2 2. PIX-C1	1. <i>SexA1</i> 2. <i>PpuMI</i>	rF9
rF9 E219Q		1. PIX-N3 2. PIX-C3 3. PIX-N4 4. PIX-C2	1. <i>EcoR1</i> 2. <i>SapI</i> 3. <i>SapI</i> 4. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 K98T		1. PIX-N5 2. PIX-C1	1. <i>SfuI</i> 2. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 Y99L		1. PIX-N6 2. PIX-C2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 K98M		1. PIX-N7 2. PIX-C2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 K98R		1. PIX-N8 2. PIX-C2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 Y99A		1. PIX-N9 2. PIX-C2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 Y99T		1. PIX-N10 2. PIX-C2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 Δ A95a/A95b		1. PIX-N11 2. PIX-C2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>HindIII</i>	rF9
rF9 99Loop(F10) Y94F Y177T		1. PIX-N12 2. PIX-C5 3. PIX-N14 4. PIX-C2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>SapI</i> 3. <i>SapI</i> 4. <i>HindIII</i>	rF9 99Loop(F10)
rF9 K98T Y94F Y177T		1. PIX-N13 2. PIX-C5 3. PIX-N14 4. #2	1. <i>SfuI</i> 2. <i>SapI</i> 3. <i>SapI</i> 4. <i>HindIII</i>	rF9 K98T

Tabelle III-10: Primer und Plasmide für die Herstellung von rF7-Varianten

Plasmid	Oligo	Enzym	Template / kloniert in
rF7-10AP	1. PVII-N1 2. PVII-C1	1. <i>XbaI</i> 2. <i>NcoI</i>	rF10 / rF7
rF7-Gla	1. PVII-N3 2. PVII-C3	1. <i>EcoR1</i> 2. <i>HindIII</i>	ATCC humFacVII / rF7
rF7-EGF1	1. PVII-N4 2. PVII-C3	1. <i>EcoR1</i> 2. <i>HindIII</i>	ATCC humFacVII / rF7
rF7-10EGF2	1. #69 2. PVII-C4	1. <i>EcoR1</i> 2. <i>NcoI</i>	rF10 / rF7
rF7-9EGF2	1. PVII-N5 2. PVII-C5	1. <i>EcoR1</i> 2. <i>NcoI</i>	rF9 / rF7

Tabelle III-11: Primer und Plasmide für die Herstellung von S/A190-Mutanten

Plasmid	PCR	Oligo	Enzym	Template/ kloniert in
rF10 A190S		1. PX-N1 2. PX-C1 3. PX-N2 4. PX-C2	1. <i>NarI</i> 2. <i>SapI</i> 3. <i>SapI</i> 4. <i>CelII</i>	rF10
rTry S190A		1. PTRY-N1 2. PTRY-C1 3. PTRY-N2 4. PTRY-C2	1. <i>Van911</i> 2. <i>SapI</i> 3. <i>SapI</i> 4. <i>HindIII</i>	rTry
rXY S190A		1. PTRY-N1 2. PTRY-C1 3. PTRY-N2 4. PTRY-C2	1. <i>Van911</i> 2. <i>SapI</i> 3. <i>SapI</i> 4. <i>HindIII</i>	rXY

III.2.1.4 Klonierung in *E. coli*

III.2.1.4.1 Präparativer Verdau

Zur Klonierung der PCR Produkte wurden jeweils etwa 2µg von Produkt und Vektor mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten. Die Reaktion wurde anschließend auf einem Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten Banden wie beschrieben ausgeschnitten und aufgereinigt.

III.2.1.4.2 Ligation

Vektor und PCR Produkt wurden mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Molecular Biochemicals) nach Angaben des Herstellers ligiert.

III.2.1.4.3 Transformation

Kompetente *E. coli* UT5600 (pUBS520) Zellen wurden nach der CaCl₂ Methode (Sambrook *et. al.*, 1989) hergestellt und in 100µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurden Aliquots vorsichtig auf Eis aufgetaut, der Ligationsansatz hinzugegeben, 30min auf Eis und 1min bei 42°C inkubiert, 0,7ml LB-Medium hinzugegeben und weitere 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Selektionsagar (100µg/ml Ampicillin, 50µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet.

III.2.1.4.4 Analyse der Transformanden

Einzelkolonien der Transformation wurden in 1,5ml LB-Selektionsmedium 6 - 18 Stunden bei 37°C vermehrt und die Plasmid-DNA mit dem High Pure Plasmid Purification Kit (Roche Molecular Biochemicals) isoliert. Ein analytischer Restriktionsverdau mit anschließender Gelelektrophorese gab Aufschluß über den Klonierungserfolg. Jeweils 3 bis 5 Klone wurden für die nachfolgende Sequenzierung und Expressionsanalyse ausgewählt.

III.2.1.4.5 Expressionsanalyse

5ml DYT-Selektionsmedium wurden mit 2% einer LB-ÜN-Kultur angeimpft und bei 37°C bebrütet. Bei einer OD₅₅₀ von 0,7 - 0,9 wurde die Expression durch Zugabe von 1-5mM IPTG induziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (typischerweise 0, 4, 18 Stunden nach Induktion) wurde 1OD Kultur abgenommen, abzentrifugiert und das Pellet bei -20°C gelagert.

Die Pellets wurden in 250µl 20mM Tris/HCl (pH 7.2) gelöst und die Zellen durch Ultraschallbehandlung (2 Pulse à 30sec mit 50% Intensität) mit einem Sonifier[®] Cell Disruptor B15 (Brenson, Heusenstamm) aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (14000g, 10min, 4°C) abgetrennt und in 150µl reduzierendem 1x SDS-Probenpuffer resuspendiert. Der Überstand wurde mit reduzierendem 5x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und über SDS-PAGE analysiert.

III.2.2 Proteinanalytische Methoden

III.2.2.1 Polyacrylamid - Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen anhand ihrer Größe auf Polyacrylamidgele wurde nach der Methode von Laemmli et al. (1970) durchgeführt.

III.2.2.1.1 SDS-PAGE

Für die denaturierende SDS-PAGE wurden 15% Trenngele und 3% Sammelgele mit 0,1% SDS gegossen.

Die Proben wurden in SDS-haltigem Probenpuffer aufgekocht. Je nach Fragestellung wurden die Proben zusätzlich durch Gegenwart von 100 mM DTT reduziert, um kovalent über Disulfidbrücken verbundene Fragmente oder Proteine einzeln auftrennen zu können. Es wurden typischerweise 8µl Probe in die Gelspuren geladen. Als Größenstandard wurden 5µl des 1:20 verdünnten Premixed Protein Molecular Weight Marker (Roche Molecular Biochemicals) verwendet.

Die Auftrennung erfolgte in Gegenwart von SDS-haltigem Laufpuffer in einer vertikalen Gelapparatur (Biometra, Göttingen) bei 80 bis 180V.

Nach Austritt der Bromphenolblau-Lauffront aus dem Gel (nach 1,5 bis 2 Stunden Laufzeit) wurde der Lauf gestoppt und das Gel 10min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Entfärbung erfolgte mit H₂O.

Die entfärbten Gele wurden zur Dokumentation photographiert oder kopiert und anschließend mit etwas Wasser und Na-Azid in Plastikfolie eingeschweißt und bei 4°C aufbewahrt.

III.2.2.1.2 Native PAGE

Für native PAGE wurden 4-20% Tris-Glycin NOVEX[®]-Gradientengele der Firma INVITROGEN[®] (Groningen, NL) verwendet. Es wurden SDS-freier Proben- und Laufpuffer verwendet; die Proben wurden weder reduziert noch aufgekocht.

Die Elektrophorese wurde in der NOVEX[®] X-Cell-MiniCell Gelkammer bei 6-12mA je Gel für ca. 6 Stunden durchgeführt. Nach Austreten der blauen Lauffront wurde der Lauf gestoppt und die Gele wie für SDS-PAGE beschrieben gefärbt und entfärbt.

III.2.2.2 Western-Blot-Analyse

Detektion kleiner Proteinmengen in Zellextrakten oder anderen Gemischen ist durch Markierung des gesuchten Proteins mit spezifischen Antikörpern und anschließender Farbreaktion möglich. Diese Methode wurde hier verwendet, um kleine Mengen richtig gefalteten rekombinanten Faktor VII nachzuweisen.

Das Renaturat wurde zunächst über SDS-PAGE aufgetrennt und die aufgetrennten Proteine anschließend mit der semi-dry blotting Methode (Burnette, 1981) auf eine PVDF Membran (Roche Molecular Biochemicals) übertragen. Die Membran wurde anschließend 10min in Ponceau-Lösung inkubiert und nach der Kennzeichnung der Größenmarker in TBS entfärbt. Das Gel wurde in Coomassie-Lösung gefärbt und mit Wasser entfärbt.

Absättigung unspezifischer Proteinbindestellen auf der Membran erfolgte durch einstündige Inkubation in 1% Blocking Lösung (1% Blocking Reagens [Roche Molecular Biochemicals] in TBS). Im Anschluß daran wurde der in 0,5% Blockinglösung verdünnte primäre Antikörper eine Stunde an die Membran gebunden, ungebundener Antikörper durch Waschen der Membran mit TBST (TBS mit 0,1% Tween 20) entfernt und der sekundäre Antikörper (Alkalische Phosphatase [AP] Konjugat), welcher den Fc-Anteil des primären Antikörpers erkennt, gebunden. Nach erneutem Waschen der Membran wurde der sekundäre Antikörper durch eine Farbreaktion der AP mit den Substraten BCIP und NBT (Roche Molecular Biochemicals) in 200mM Tris/HCl (pH 9.5), 10mM MgCl₂ nachgewiesen. Die Farbreaktion war nach wenigen Minuten abgeschlossen und wurde mit Wasser abgestoppt. Die fertigen Membranen wurden getrocknet und zum Schutz vor mechanischer Beschädigung in Plastikfolie eingeschweißt.

III.2.2.3 Konzentrierung von Proteinen

III.2.2.3.1 Konzentrierung durch Fällung

Bei den beiden beschriebenen Methoden wird das Protein bei der Fällung denaturiert, sie eignen sich daher nur, um Proteine aus verdünnten Lösungen auf dem SDS-PAGE Gel oder in ähnlichen, ebenfalls denaturierenden Methoden sichtbar zu machen; funktionelle Assays sind nach der Fällung nicht mehr möglich.

III.2.2.3.1.1 TCA-Fällung

Bei der TCA-Fällung wurde die Probe mit 100%iger TCA auf eine Endkonzentration von etwa 10-20% TCA gebracht, 30min auf Eis inkubiert und 10min bei 4°C mit 14000g zentrifugiert. Das Pellet wurde 2x mit Diethylether gewaschen, im Speed Vac Concentrator (Bachofner, Reutlingen) getrocknet und in einem gewünschten Volumen 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Verfärbte sich der Indikator Bromphenolblau im Probenpuffer von blau nach gelb, wurde die restliche TCA durch Ammoniumdampf neutralisiert, bis die Probe wieder blau und somit neutral bis alkalisch war. Anschließend wurde die Probe hitzedenaturiert und über SDS-PAGE analysiert.

III.2.2.3.1.2 Na-DOC Fällung

Bei der Na-DOC Fällung wurde zunächst die Probe mit 1% einer 1%igen Natrium-Desoxycholat Lösung versetzt und der pH-Wert mit Phosphorsäure auf ca. 3 eingestellt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10min bei RT und 14000g. Das Pellet wurde in einem gewünschten Volumen 1x SDS-Probenpuffer aufgenommen und der pH-Wert der Probe durch Ammoniumdampf wieder in den neutralen bis alkalischen Bereich gebracht. Nach Hitzedenaturierung wurde die Probe über SDS-PAGE aufgetrennt.

III.2.2.3.2 Konzentrierung durch Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration wird das Protein von einer Membran zurückgehalten, während Lösungsmittelmoleküle (meist Wasser) und niedermolekulare Pufferbestandteile durch Druck oder Zentrifugationskräfte durch die Membran gepreßt werden.

Zur Aufkonzentrierung großer Volumina (0,5 - 13l) wurde in der vorliegenden Arbeit das Provario Tangentialflußsystem von Pall Filtron (Dreieich) verwendet, für kleinere Volumina wurden die verschiedenen Zentrifugationseinheiten Jumbosep, Macrosep, Microsep und Nanosep von Pall Filtron eingesetzt. Die Ausschlußgrenzen der Minisetze (Provario) und der Zentrifugationseinheiten richteten sich nach den Größen der bearbeiteten Proteine. Für rekombinanten Faktor VIIa und Trypsin wurden 3K Membranen verwendet, für alle anderen Proteine eine Ausschlußgrenze von 10K.

III.2.2.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde photometrisch über die Absorption bei 280nm bestimmt. Aus der Aminosäuresequenz der Proteine läßt sich anhand der Anzahl der Tryptophanreste der molare Extinktionskoeffizient (ϵ_{280}) für das Protein errechnen. Bei ungereinigten Präparationen wurde ein durchschnittlicher Extinktionskoeffizient von 1 angenommen.

III.2.3 Herstellung rekombinanter Gerinnungsproteasen

III.2.3.1 Allgemeines

III.2.3.1.1 Umpuffern durch Dialyse

Alle Dialysen wurden bei 4°C gegen ein mindestens 100-faches Volumen Dialysepuffer durchgeführt. Das 100-fache Volumen konnte bei kleinen Probenvolumina in einem Schritt erreicht werden (Beispiel: 1ml gegen 100ml), bei größeren Volumina wurden die Dialysen in mehreren Schritten durchgeführt (Beispiel: 1l gegen 2 x 10l). Je größer das Probenvolumen und je viskoser die Lösung war, desto länger wurden die einzelnen Schritte durchgeführt, um die verlängerten Diffusionszeiten auszugleichen.

III.2.3.2 Präparative Expression

III.2.3.2.1 Labormaßstab

Für die präparative Expression im Labormaßstab wurden 1,5l DYT-Selektionsmedium (100ml/l Ampicillin, 50 mg/l Kanamycin) mit 2% einer ÜN-Kultur beimpft und die Kultur unter Schütteln bei 37°C bebrütet. Bei einer OD_{550} von 0,6-0,9 wurde die Expression durch Zugabe von IPTG ad 1 mM induziert. Nach etwa 6 Stunden Expression wurde die Biomasse durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GS3 Rotor, 6000rpm, 15min, 4°C) geerntet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert. Die Ausbeute lag bei etwa 4-5g Biomasse (Naßgewicht) je Liter Schüttelkultur.

III.2.3.2.2 Fermentationsmaßstab

Um eine größere Menge an Biomasse und Expressionsprodukt zu erhalten wurden die meisten Varianten der rekombinanten Gerinnungsproteasen im 10 l Maßstab (Biostat E, B.Braun Melsungen AG, Melsungen) fermentiert. Es wurde hierzu ein Standardverfahren der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) für das Expressionssystem *E. coli* UT5600/pSA/pUBS520 eingesetzt. Fermentationsmedium mit 100mg/l Ampicillin und 50mg/l Kanamycin wurde mit 1% Vorkultur angeimpft, unter pH-Kontrolle (pH 7.0 ± 0.3, mit Glucose und NH₃) und pO₂ Regelung (20%) angezogen, bei $OD_{578} = 25$ mit 1mM IPTG indu-

ziert und unter Dosagezufuhr (50% Springer-Hefe) bis Erreichen der stationären Phase weiter fermentiert. Es wurde typischerweise eine End-OD₅₇₈ von 50-100 erreicht. Die Biomasse wurde durch Zentrifugation in einer GLE Padberg-Durchflusszentrifuge (Carl Padberg, Lahr) geerntet. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 13g Bio-Feuchtmasse in 10l je OD₅₇₈.

III.2.3.3 Reinigung der Inclusion Bodies

III.2.3.3.1 Labormaßstab

Dieses Protokoll wurde für die Aufarbeitung der Biomasse aus der Expression in bis zu 3 Liter Schüttelkultur angewendet. Die Biomasse wurde in 5ml/g Feuchtgewicht 50mM Tris/HCl (pH 7.2) suspendiert, mit 0,25mg/ml Lysozym versetzt und 30min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 2mM MgCl₂ und 10µg/ml DNaseI zugegeben und die Zellen mittels Hochdruckdispersion in einer French[®] Press (SLM Amico, Urbana, IL, USA) aufgeschlossen. Nachdem die DNA in einem 30min Inkubationsschritt bei RT verdaut wurde, wurde der Ansatz auf 20mM EDTA, 500mM NaCl und 2% Triton X-100 gebracht. Durch 30min Schütteln bei RT wurden die Membranbestandteile solubilisiert. Anschließend wurden die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GSA-Rotor, 12000 rpm, 15min, 4°C) und das Pellet zweimal durch 30min Rühren bei 4°C mit 50mM Tris/HCl, pH 7.2, 20mM EDTA gewaschen. Die gereinigten IBs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Ausbeute betrug etwa 300mg IB-Feuchtmasse (FM) je g Feucht-Biomasse, entsprechend 100mg Trockenmasse und 30mg rekombinantes Protein.

III.2.3.3.2 Fermentationsmaßstab

Für die Aufarbeitung größerer Mengen an Biomasse wurde diese in 5ml/g FM 50mM Tris/HCl (pH 8.0) 1mM MgSO₄ aufgetaut und mit dem Zauberstab Typ M100 (ESGE, Schweiz) homogenisiert. Nach Zugabe von Lysozym (3mg/g FM) und Benzonase (5 U/g FM) wurde 20 min ungekühlt gerührt, die Zellen mit Hochdruck (1000 bar) in einer APV-Gaulin Lab60-15 RBF Hochdruckpresse aufgeschlossen, weitere 30U/g FM Benzonase zugesetzt und nochmals 60min bei 37°C gerührt. Anschließend wurde der Aufschluß mit 0,5ml/ml Brij-Puffer versetzt und die Membranbestandteile durch 30 min Rühren gelöst. Die Suspension wurde in der Padberg-Zentrifuge abzentrifugiert (13 l/Stunde), das Pellet in 3ml/g FM 50mM Tris, 20mM EDTA (pH 6.5) mit dem Ultrathorax T25 Basic (IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert, 30min gerührt und in der Sorvall RC-5B Zentrifuge (GS-3 Rotor, 9000rpm, 60min, 4°C) sedimentiert. Die gereinigten IBs wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Ausbeuten entsprachen den Ausbeuten im Labormaßstab.

III.2.3.4 Solubilisierung der Inclusion Bodies

Die gereinigten IBs wurden nach einem für Proteine mit vielen Cysteinresten optimierten Verfahren (Hopfner, 1997) in Gegenwart eines gemischten Redoxsystems (Glutathion) solubilisiert. Bei diesem Verfahren wird das denaturierte Protein durch das chaotrope Guanidinium-HCl in Lösung gebracht. Dies wird oft durch die Quervernetzung der Proteinmoleküle über Disulfidbrücken erschwert. Um dieses Problem zu überwinden, werden die Cysteinreste oft durch Zugabe von DTT oder anderen Reduktionsmitteln reduziert (Rudolph et al., 1996). Im Gegensatz dazu wird hier auf eine vollständige Reduktion verzichtet und stattdessen die Cysteinreste mit Glutathion derivatisiert. Da das Redoxpotential der Derivate dem der Disulfidbrücken ähnelt, kann das Glutathion im folgenden Rückfaltungsprozeß als Katalysator für

ein „Shuffling“ dienen, bis die optimalen und somit energetisch stabileren Disulfidbrücken ausgebildet sind.

Bei der Solubilisierung wurden 0,1g IB-FM/ml Solubilisierungspuffer 3 Stunden bei RT gerührt. Die Derivatisierungsreaktion der Cysteinreste mit dem Glutathion-Redoxsystem wurde durch Absenken des pHs auf 4-5 gestoppt und anschließend das Redoxsystem durch Dialyse entfernt. Dialysiert wurde entweder gegen 6M GdmCl, 20mM EDTA, pH 4-5 oder gegen Wasser mit 1mM EDTA. In diesem Fall präzipitierte das solubilierte Protein. Es wurde nach der Dialyse durch sanfte Zentrifugation (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GSA-Rotor, 5000rpm, 15min, 4°C) sedimentiert und anschließend in einer dem Ausgangsvolumen des Solubilisats entsprechenden Menge 6M GdmCl, 20mM EDTA, pH 4-5 unter Rühren gelöst. Da das Protein in seiner derivatisierten Form ausgefallen war, war es nun nicht mehr quervernetzt und löste sich schnell wieder.

III.2.3.5 Naturierung von Inclusion Body Protein

III.2.3.5.1 Standardverfahren für die Naturierung von rekombinanten Serinproteasen

Rekombinanter Faktor IXa, Xa, XYa (siehe Einleitung) sowie Trypsin wurden nach einem bei der Firma Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim) entwickelten und für diese Enzyme optimierten Verfahren hergestellt (Kohnert et al., 1996, Kopetzki et al., 1997).

Das Solubilisat wurde in 2-3 Portionen von je 10ml/l Renaturierungspuffer unter Rühren langsam in den Renaturierungspuffer (4°C) gegeben (*Pulse*). Dadurch wurden die denaturierten Proteinmoleküle schnell voneinander entfernt, sodass eine Aggregation erschwert wurde und die Faltung der Moleküle idealerweise einer Kinetik erster Ordnung folgen sollte. Die Pulse wurden im Abstand von 12 bis 24 Stunden gegeben. Vor jedem Puls wurde frisches Cystein x H₂O, entsprechend einer Endkonzentration von 0,5mM in den Renaturierungspuffer eingerührt. Zwischen den Pulsen wurde nicht gerührt, um einen unnötigen Sauerstoffeintrag und somit Oxidation des Cysteins zu vermeiden. 48 Stunden nach dem letzten Puls wurde das Renaturat abzentrifugiert (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GSA-Rotor, 13000rpm, 15min, 4°C) und Schwebeteilchen über ein Druckfiltrationsgerät der Firma Sartorius (Göttingen), bestückt mit einem 0,45µm Nitrocellulosefilter (Sartorius) und einem 250 K Tiefenfilter (Seitz, Bad Kreuznach) abgetrennt. Anschließend wurde das Renaturat mit dem Provario-System auf 1/10 des Ausgangsvolumen eingengt und als Vorbereitung für die weitere Aufreinigung gegen einen wäßrigen Puffer dialysiert (20mM NaH₂PO₄ [pH 6.5], 200mM NaCl für Trypsin; 20mM Tris/HCl [pH 8.0], 50mM NaCl für rF9, rF10, rXY). Nach der Dialyse wurde präzipitiertes Protein durch Zentrifugation (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GSA-Rotor, 13000rpm, 15min, 4°C) und Sterilfiltration (0,22µm Stericup Express™ Filtrationseinheiten (Millipore, Bedford, USA) abgetrennt.

III.2.3.5.2 Optimierung eines Renaturierungsverfahrens für rekombinanten Faktor VII

Rekombinanter Faktor VII ließ sich nicht nach dem üblichen Renaturierungsverfahren herstellen. Um die richtigen Bedingungen zu ermitteln wurden verschiedene Parameter variiert: Temperatur, Inkubationszeit, Proteinkonzentration, Pufferzusammensetzung und Redoxsystem bei der Solubilisierung. Die untersuchten Bedingungen sind detailliert in Kapitel IV.2 beschrieben.

Die verschiedenen Bedingungen wurden mit jeweils 10ml Puffer getestet. Nach Zugabe der gewünschten Solubilisatmenge zum Renaturierungspuffer wurde die Lösung sofort durch Vortexen gründlich durchmischt. Nach Ablauf der vorgesehenen Inkubationszeit wurden 2ml Aliquots des Renaturats in Slide-A-Lyzer Dialyserahmen gegen 20mM Tris pH 8.5, 5mM CaCl₂ dialysiert.

III.2.3.5.2.1 Untersuchung der Naturierungseffizienz

Nach der Dialyse wurde ausgefallenes Protein durch Zentrifugation (Eppendorf Tischzentrifuge, 14000 g, 4°C, 15min) entfernt. Der klare Überstand wurde mit TCA gefällt und in 1x SDS-Puffer (ohne DTT, 1/40 des Volumens vor der Dialyse) wieder aufgenommen. Das so aufkonzentrierte Renaturat wurde per SDS-PAGE auf prominente Banden im richtigen Molekulargewichtsbereich untersucht und die Identität der Banden durch Western-Blot Analyse mit einem polyklonalen Faktor VII-Antikörper überprüft.

III.2.3.5.2.2 Bestimmung freier SH-Gruppen mit Ellman's Reagens

Zu verschiedenen Zeitpunkten im Renaturierungsprozeß wurden die freien SH-Gruppen im Ansatz bestimmt, um zu untersuchen, wie schnell das in der Renaturierung eingesetzte Cystein aufgebraucht wurde.

Hierzu wurden Aliquots der Renaturierungsansätze 1:10 in Puffer 1 für SH-Gruppen-Bestimmung verdünnt, mit 30µl/ml DNTP-Lösung versetzt und nach 15min Inkubation bei RT die Absorptionsänderung bei 410nm bestimmt. Eine Änderung der Absorption um eine Einheit (d=1 cm) entspricht 0,07353mM freier SH-Gruppen.

III.2.3.6 Reinigung der Enzyme

III.2.3.6.1 Reinigung der Zymogene

III.2.3.6.1.1 rF9, rF10 und rXY

Das dialysierte Renaturat von rF9-, rF10- und rXY- Varianten wurde im ersten Schritt über Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose-ff, Amersham Pharmacia Biotech, Upsala, Schweden) aufgereinigt. 5ml Q-Sepharose-ff je 1g IBs wurden mit Dialysepuffer äquilibriert und das Renaturat mit einem Fluß von 9ml/min aufgetragen. Anschließend wurde mit Äquilibriumspuffer bis zum Erreichen einer Basislinie gewaschen und das gebundene Protein im NaCl-Gradienten (50-500mM NaCl, 20mM Tris/HCl pH 8.0, 8CV) eluiert. rF9, rF10 und rXY eluierten bei etwa 200mM NaCl zu Beginn des Elutionsprofils.

rF9 wurde im Anschluß durch Affinitätschromatographie an Heparin-Sepharose (Pharmacia) weiter aufgereinigt. 1ml Heparin-Sepharose je 7,5mg vorgereinigter rF9 wurde mit 20mM Tris/HCl (pH 8.0), 200mM NaCl äquilibriert und das Protein mit einem Fluß von 9ml/min aufgetragen. Restliche *E. coli* Verunreinigungen befanden sich im Durchlauf. Es wurde bis zum Erreichen einer Basislinie mit Äquilibriumspuffer nachgewaschen und der gebundene rF9 im NaCl-Gradienten eluiert (200-1000mM NaCl, 20mM Tris/HCl pH 8.0, 8 CV). Der saubere rF9 eluierte bei etwa 600mM NaCl. Es folgte eine Dialyse gegen 20mM Tris/HCl (pH 8.0), 200mM NaCl, 5mM CaCl₂.

III.2.3.6.1.2 rF7

rF7 wurde typischerweise in Volumina von 10-13l renaturiert. Nach der Renaturierung wurde das Renaturat zunächst abzentrifugiert (Beckmann J6B Centrifuge, Rotor JS-42, 4200rpm, 30min, 4°C). Der Überstand wurde über Faltenfilter abdekantiert, da die Pellets aufgrund der hohen Viskosität des 40% Ethylenglycol enthaltenden Renaturierungspuffers nicht sehr fest sedimentierten. Das abzentrifugierte Renaturat wurde mit 5 mM Benzamidin (BA) versetzt und über eine 3K OC Minisette bei 4°C aufkonzentriert. Dieser Schritt lief relativ langsam ab und wurde nach 2-3 Tagen bei einem Volumen von ca. 4l gestoppt. Das ankonzentrierte Renaturat wurde gegen 20mM Tris/HCl (pH 8.5), 5mM CaCl₂, 5mM BA dialysiert. Nach der

Dialyse wurde das Renaturat abzentrifugiert (Sorvall RC-5B Zentrifuge, GSA-Rotor, 13000rpm, 30min, 4°C) und über 0,22µm Stericup Express™ Filtrationseinheiten filtriert. Die Aufreinigung des rF7 erfolgte über zwei Ionenaustauschchromatographien. Im ersten Schritt wurde das dialysierte Renaturat mit 20ml/min über eine mit Dialysepuffer äquilibrierte Q-Sepharose-ff (3ml je g IBs) gepumpt und die Säule mit 1,5 CV Dialysepuffer gewaschen. Obwohl der pH-Wert um eine pH-Einheit über dem theoretischen isoelektrischen Punkt von rF7 (7.47) lag, band das richtig gefaltete Protein auch unter den Niedrigsalzbedingungen (5mM CaCl₂) nicht an den Anionenaustauscher. Im Gegensatz dazu wurden aggregierter rF7 und *E. coli* Proteine nahezu quantitativ zurückgehalten, sodass rF7 nach diesem Schritt bereits sehr sauber, aber noch stark verdünnt, im Durchlauf vorlag. Es folgte eine Kationenaustauschchromatographie mit Fractogel-EMD-SO₃⁻ (1g IBs/ml Säulenmaterial; Merck Eurolab GmbH, Darmstadt). Die Säule wurde ebenfalls mit dem Dialysepuffer äquilibriert und der Durchlauf der Q-Sepharose mit 20ml/min aufgetragen. Das gebundene Protein wurde mit 15ml/min im NaCl-Gradienten eluiert (0-700mM NaCl, 5mM CaCl₂, 5mM BA, 20mM Tris/HCl pH 8.5, 6 CV). rF7 eluierte in einem Bereich von 30 - 250mM NaCl, gefolgt von kleineren Verunreinigungen. Die rF7-enhaltenden Fraktionen wurden vereinigt, aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Ausbeute lag bei etwa 3mg rF7 je Liter *E. coli*-Fermentationsansatz.

III.2.3.6.2 Aktivierung

III.2.3.6.2.1 Aktivitätsassays

Die Untersuchung der Aktivität aller bearbeiteten Proteasen erfolgte im chromogenen Assay. Bei den verwendeten Substraten handelte es sich um Tripeptide, die die P1-P3 Erkennungssequenz der natürlichen Substrate der Proteasen nachahmten, gefolgt von einer p-Nitroanilin-Gruppe. Amidolyse dieser Substrate führte zu einer Freisetzung der pNA-Gruppe und damit einhergehend einem Anstieg der Absorption bei 405nm. Aus der linearen Anfangssteigung der Absorptionsänderung wurde die $\Delta OD_{405}/\text{min}$ berechnet, welche ein Maß für die Aktivität des untersuchten Enzyms ist. Die linearen Anfangssteigungen wurden über lineare Regression erhalten, wobei die Korrelation immer >0.99 lag.

Die Substrate wurden in sterilem destilliertem H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bei 342nm bestimmt ($\epsilon_{342} = 8270 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, Hopfner et al., 1992). Die Absorptionsänderung wurde in 1ml Plastikkuvetten in einem Kontron-Uvikon 933 Photometer (Kontron Instruments, Milano, Italien) über einen Zeitraum von 2min verfolgt.

Die Untersuchung der Enzyme rF9a, rF10a, rTry, rXYa und rF7a wurden in 50mM Tris/HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% PEG 8000 durchgeführt. In Tabelle III-12 sind die Bedingungen aufgeführt, unter denen eine $\Delta OD_{405}/\text{min}$ von etwa 0,1 erreicht wurde.

Tabelle III-12: Bedingungen im Aktivitätstest für eine $\Delta OD_{405}/\text{min}$ von 0,1

Enzym	Menge	Substrat	Konzentration
rF9a	16µg/ml	Chromozym X	1mM
rF10a	0,2µg/ml	Chromozym X	0,1mM
rTrya	0,09µg/ml	Chromozym TH	0,1mM
rXYa	0,1µg/ml	S-2222	0,1mM
rF7a	9µg/ml	Chromozym t-Pa	0,5mM

III.2.3.6.2.2 Aktivierung von rF9

Die Aktivierung der rF9-Varianten zu rF9a erfolgte mit Hilfe des Faktor X Aktivators RVV-X aus dem Klapperschlangengift RVV (Sigma). Das gereinigte RVV-X wurde freundlicherweise von Dr. Wirthensohn (Roche Diagnostics GmbH) zu Verfügung gestellt. RVV-X spaltet rF9 an der C-terminalen Schnittstelle des Aktivierungspeptids. Der zweite Schnitt zur Entfernung des Aktivierungspeptids erfolgt autokatalytisch durch rF9a.

RVV-X wurde in einem Verhältnis von 1:100 (w/w) zu dem dialysierten rF9-Pool der Heparin-Sepharose gegeben und bei RT inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen und der Verlauf der Aktivierung im Aktivitätsassay verfolgt. Außerdem wurden Proben für reduzierende und nicht reduzierende SDS-PAGE hergestellt. Die Dauer der Aktivierung war abhängig von den Eigenschaften der zu aktivierenden Mutante und lag im Durchschnitt bei ca. 24 Stunden. Die Aktivierung wurde nach Erreichen eines Plateaus im Aktivitätstest durch Dialyse gegen 20mM Tris/HCl, pH 7.8, 50mM NaCl gestoppt.

III.2.3.6.2.3 Aktivierung von rF10

Auch rF10 wurde mit RVV-X aktiviert. Der Pool der Q-Sepharose wurde ad 10mM mit CaCl₂ versetzt, RVV-X im Verhältnis 1:30 zugegeben und bei 37°C inkubiert. Der Verlauf der Aktivierung wurde über Aktivitätstests und SDS-PAGE verfolgt. Nach etwa 10 Stunden war die Aktivierung abgeschlossen und rF10a wurde sofort über BA-Sepharose weiter aufgereinigt.

III.2.3.6.2.4 Aktivierung von rXY

rXY wurde durch Enterokinase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aktiviert. Die Protease wurde im Verhältnis 1:100 (w/w) zugegeben und das Gemisch bei 37°C inkubiert. Der Verlauf der Aktivierung wurde über Aktivitätstests verfolgt. Die Aktivierung war nach etwa 3 Stunden abgeschlossen und das aktive Enzym wurde sofort über Affinitätschromatographie weiter aufgereinigt.

III.2.3.6.2.5 Aktivierung von rF7

Sobald rF7 nicht mehr stark verdünnt vorlag, sondern z.B. über den Kationenaustauscher auf 0,3 – 0,5mg/ml aufkonzentriert worden war, setzte eine autokatalytische Aktivierung des Enzyms ein. Das vorhandene BA war dann nicht mehr ausreichend, die Autoaktivierung zu unterbinden, weshalb nach dem zweiten Aufreinigungsschritt darauf Wert gelegt wurde, das Enzym möglichst schnell einzufrieren.

Zur Aktivierung wurden Aliquots des Enzyms aufgetaut und gegen 20mM Tris/HCl, pH 8.5, 5mM CaCl₂, 150mM NaCl bei 4 °C über Nacht dialysiert. Das aktive Enzym war über Monate bei 4°C stabil.

III.2.3.6.3 Reinigung der aktiven Enzyme

III.2.3.6.3.1 rTry

Bei dem hergestellten rekombinanten Trypsin handelte es sich um eine sich autokatalytisch aktivierende Variante des Enzyms (Kopetzki et al., 1997). Während der Dialyse gegen Aktivierungspuffer (20mM NaH₂PO₄ [pH 6,5], 200mM NaCl [15h, 4°C]) aktivierte das Enzym sich vollständig. Das aktive Trypsin wurde über Affinitätschromatographie mit BA-Sepharose von falsch gefaltetem Trypsin und *E. coli* Proteinen abgetrennt: 7ml BA-Sepharose je 1g renaturierte IBs wurde mit Aktivierungspuffer äquilibriert, das dialysierte und aktivierte

Renaturat bei einem Fluß von 3ml/min aufgetragen und gewaschen. Anschließend wurde das aktive Trypsin in Aktivierungspuffer mit 10mM BA eluiert. Das gereinigte Protein wurde gegen 1mM HCl dialysiert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

III.2.3.6.3.2 rXYa

Aktiviertes rXYa wurde über BA-Sepharose aufgereinigt, um nicht aktiviertes Enzym und die Enterokinase abzutrennen. Der Aktivierungsansatz wurde auf eine mit 20mM Tris/HCl (pH 8.0) 250mM NaCl äquilibrierte BA-Sepharose-Säule (1ml/mg rXYa) mit 2,5ml/min aufgetragen, gewaschen und mit 10mM BA eluiert. Das gereinigte Enzym wurde gegen 1mM HCl oder 20mM Tris/HCl (pH 8.0) dialysiert und bei -80°C gelagert.

III.2.3.6.3.3 rF9a

Die Abtrennung von nicht aktiviertem oder überverdautem rF9 und RVV-X von rF9a erfolgte über einen Anionenaustauscher. Der isoelektrische Punkt von rF9a liegt etwas höher als der des Zymogens (pI = 7.79 versus 6.74), da das saure Aktivierungspeptid entfernt wurde. Diese Verschiebung des pI wurde für die Nachreinigung ausgenutzt. Der dialysierte Aktivierungsansatz wurde auf mit Dialysepuffer äquilibrierte Q-Sepharose aufgetragen (7,5mg Protein / ml Säulenmaterial; 4 ml/min). Nicht aktivierter oder überverdauter rF9 sowie RVV-X banden an den Ionenaustauscher, rF9a befand sich im Durchlauf. Der gereinigte rF9a wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

III.2.3.6.3.4 rF10a

Die Aufreinigung des rF10a wurde über BA-Sepharose vorgenommen. Im Gegensatz zu rTrya und rXYa bindet rF10a nicht sehr fest an BA-Sepharose, sondern wird im Vergleich zu den Verunreinigungen lediglich etwas retardiert. Aus diesem Grund richtet sich bei dieser Aufreinigung das Bettvolumen der Säule nicht so sehr nach der Proteinmenge, sondern vielmehr nach dem Volumen des aufgetragenen Proteins und sollte mindestens das 1,5-fache Volumen betragen. Die BA-Sepharose wurde mit 20mM Tris/HCl (pH 8.0), 200mM NaCl äquilibriert, der Aktivierungsansatz mit 2,5 ml/min aufgetragen, mit Äquilibrierungspuffer bis zur Annäherung an die Basislinie gewaschen und rF10a mit 10mM BA eluiert. Das gereinigte Enzym wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

III.2.4 Enzymatische Methoden

III.2.4.1 Titration der aktiven Zentren

Für eine genaue Untersuchung der katalytischen Eigenschaften von Enzymen ist es nötig, die exakte Konzentration an aktivem Enzym in der Reaktion zu kennen. Die Konzentrationsbestimmung wurde über eine Titration der aktiven Zentren mit stöchiometrisch wirkenden Inhibitoren durchgeführt. rF9a und rF10a wurden mit ATIII (Lozier et al., 1990), rTrya und rXYa mit 4-NPGB titriert (Fiedler et al., 1984). ATIII wurde mit 4-NPGB-titriertem Thrombin titriert.

III.2.4.1.1 rTrya, rXYa und Thrombin

Die Titration von rTrya, rXYa und Thrombin erfolgte mit Hilfe des Inhibitors 4-NPGB. Dieser Inhibitor acyliert das katalytische Serin in Serinproteasen unter Freisetzung stochiometrischer Mengen von 4-Nitrophenol, was zu einer photometrisch meßbaren Gelbfärbung der Lösung führt. Diese Acylierungsreaktion läuft sehr schnell ab und führt zu einem schnellen Anstieg der Absorption. In einer langsameren Reaktion wird die Acyl-Enzym-Bindung wieder hydrolysiert und ein zweites 4-NPGB kann mit dem aktiven Zentrum reagieren. Bei Trypsin und ähnlich reaktiven Proteasen fällt diese Reaktion jedoch nicht ins Gewicht, und über den anfängliche Absorptionsanstieg kann über den molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{410} = 16595 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Molarität der aktiven Zentren errechnet werden.

200µl einer 6-30µM Enzymlösung wurden mit 800µl Veronalpuffer (100mM Veronal, 20mM CaCl₂, pH 8.3) gemischt, 5µl einer 10mM 4-NPGB-Lösung zugegeben, schnell gemischt, ΔOD_{410} gemessen und auf den Zeitpunkt des Mischens extrapoliert. Aus diesem Absorptionsanstieg wurde die Enzymkonzentration errechnet.

III.2.4.1.2 ATIII

ATIII wurde mit zuvor titriertem Thrombin titriert. Verschiedene Mengen einer ATIII Lösung (0, 3, 6, 9, 12, 15µl) wurden mit 5µl einer 20-40µM Thrombin-Lösung für 5min bei RT inkubiert (Gesamtvolumen 60µl, 50mM Tris/HCl, pH 8.0, 200mM NaCl, 0,1% PEG 8000, 5µg/ml Heparin, 1,25mg/ml BSA). Die Restaktivität des Thrombin wurde im chromogenen Assay durch Zugabe von 0,1-10µl Titrationsansatz in 1ml 50mM Tris/HCl (pH 8.0), 200mM NaCl, 0,1% PEG 8000, 0,1mM Chromozym TH bestimmt. Extrapolation der Restaktivität gegen 0 ergab die ATIII-Menge, welche für komplette stochiometrische Inhibition der bekannten Thrombinmenge notwendig war. Daraus ließ sich die Molarität der ATIII Lösung rückrechnen.

III.2.4.1.3 rF9a und rF10a

rF9a und rF10a wurden mit ATIII titriert. Die Titration wurde ähnlich wie für ATIII beschrieben durchgeführt. In 60µl Gesamtvolumen (50mM Tris/HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% PEG 8000, 1,25mg/ml BSA, 500µg/ml Heparin) wurde zu titrierendes Enzym mit verschiedenen ATIII-Mengen für 10min bei RT inkubiert und die Restaktivität des gesamten Ansatzes im chromogenen Assay bestimmt (50mM Tris/HCl (pH 8.0), 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% PEG 8000, 1mM Chromozym X). Die Molarität der aktiven Zentren in der Enzymlösung ergab sich aus der Extrapolation der Restaktivität gegen 0.

III.2.4.2 Untersuchung katalytischer Eigenschaften

Für die Ermittlung von k_{cat} und K_m eines Enzyms mit einem bestimmten Substrat wurde die lineare Anfangsgeschwindigkeit der Substrathydrolyse bei 7 verschiedenen Substratkonzentrationen einer 2-fachen Verdünnungsreihe (Startkonzentration je nach Enzym und Löslichkeit des Substrats 2-5mM) bestimmt. Dazu wurde zunächst die $\Delta OD_{405}/\text{min}$ wie unter III.2.3.6.2.1 beschrieben bei 25°C gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeit v errechnete sich aus der Gleichung

$$v = \frac{\Delta OD_{405}}{\text{min} * \epsilon_{405} * 60 \text{ sec}}$$

Der molare Extinktionskoeffizient für p-NA unter den gegebenen Reaktionsbedingungen beträgt $\epsilon_{405} = 9920 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Lottenberg et al., 1981).

Aus der Reaktionsgeschwindigkeit wurden über die Michaelis-Menten-Gleichung durch nichtlineare Kurvenanpassung mit Hilfe des Programms Sigmaplot (Jandel Scientific GmbH, Erkrath) die kinetischen Konstanten k_{cat} und K_m errechnet.

$$v = e_T \frac{k_{\text{cat}} [S]}{K_m + [S]}$$

[S]: Substratkonzentration, e_T : Enzymkonzentration

Für rF9a und die meisten rF9a Mutanten war K_m sehr viel größer als die höchste verwendete Substratkonzentration. In diesem Fall reduzierte sich die Gleichung auf:

$$v = e_T \frac{k_{\text{cat}} [S]}{K_m}$$

Aus dieser Gleichung konnte nur die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m bestimmt werden.

Die Dissoziationskonstante für die Bindung eines kompetitiven Inhibitors an das aktive Zentrum (K_i) wurde über die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen einer Verdünnungsreihe in Gegenwart verschiedener Inhibitorkonzentrationen ([I]) ermittelt (nach Bisswanger, 1979).

Die kompetitive Inhibition eines Enzyms folgt der Gleichung:

$$v = v_{\text{max}} \frac{[S]}{[S] + K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)}$$

Die doppelt reziproke Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration nach Lineweaver-Burk ergibt eine Geradenschar für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen, die einen gemeinsamen Ordinatenschnittpunkt bei $1/v_{\text{max}}$ haben.

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\text{max}}} + \frac{K_m}{v_{\text{max}}} \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) \frac{1}{[S]}$$

Die Steigung der einzelnen Geraden des Lineweaver-Burk-Diagramms hat den Wert

$$\text{Steigung} = \frac{K_m}{v_{\text{max}}} + \frac{K_m [I]}{v_{\text{max}} K_i}$$

Auftragung der Steigungen gegen die jeweiligen Inhibitorkonzentrationen ergibt wiederum eine Gerade, deren Extrapolation auf die Abszisse K_i ergibt.

III.3 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

III.3.1 Kristallisation von Proteinen

Alle Kristallisationsexperimente wurden nach der Dampfdiffusionsmethode (McPherson, 1976) durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Tropfen einer verdünnten Lösung in einer abgeschlossenen Kammer zusammen mit einer größeren Menge höher konzentrierter Lösung (Reservoir) inkubiert. Über den Dampfdruck stellt sich im verdünnten Tropfen die Konzentration der Reservoirlösung ein.

Mittels eines sparse matrix screens (Jancarik et al., 1991; Cudney et al., 1994) mit Reservoirlösungen, in denen eine Reihe von Zusätzen (Präzipitationsmittel, Lösungsmittel, Salze, Stabilisatoren etc.) gegen verschiedene pH-Werte variiert wurde, erfolgte die Suche nach Kristallisationsbedingungen für die verschiedenen im Verlauf der Arbeit hergestellten Varianten von Gerinnungsproteasen.

Alle Screening-Experimente wurden mit sitzendem Proteintropfen in Polystyrol-Chryschem-Platten durchgeführt und bei 4°C oder 20°C inkubiert. Typischerweise wurden 500 µl Reservoirlösung eingesetzt und 1 µl Reservoir mit 1 µl Proteinlösung (6-10 mg/ml) „verdünnt“. Das langsame Aufkonzentrieren des Tropfens resultiert in einer übersättigten Proteinlösung, aus welcher unter geeigneten Bedingungen die Kristallisation des Proteins initiiert wird.

III.3.2 Datensammlung und Datenauswertung

III.3.2.1 rXYa S190A

Die rXYa S190A Kristalle wurden für die Datensammlung direkt aus dem Kristallisationsansatz in eine Quarzkapillare für röntgenographische Aufnahmen mit einem Innendurchmesser von 0,7 mm gesaugt und mittels einer ausgezogenen Pasteurpipette und dünner Filterpapierstreifen trockengelegt. Etwas Reservoirlösung wurde räumlich getrennt in der Kapillare belassen, um ein Austrocknen des Kristalls zu verhindern. Anschließend wurde die Kapillare an beiden Enden mit Glaswachs verschlossen (Harvard, Berlin).

Die Datensammlung erfolgte bei 7°C auf einem Xentronics-Detektor (Siemens-Bruker), der auf einem Rigaku R300-Generator installiert war ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$). Die Daten wurden mit dem Programm SAINT (Howard et al., 1987) indiziert und mit dem Programm XDS reduziert.

III.3.2.2 rF7a

Die rF7a-Kristalle wurden zur Messung direkt in einen Cryoloop geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Die Datensammlung und Auswertung für die zwei gelösten Kristallstrukturen sind im Ergebnis teil beschrieben.

III.3.3 Pattersonsuche

Die Lage der Proteinmoleküle in der asymmetrischen Einheit wurde über Pattersonsuche mit dem Programm AMoRe (Navazza, 1944) bestimmt. Als Suchmodell dienten für rXY A190 die Koordinaten von PPACK-rXYa (PDB-Eintrag 1fxy, Hopfner et al., 1998). Für rF7a^{BA}

wurden die Koordinaten des PDB-Eintrags 1cvw (Kemball-Cook et al., 1999) verwendet, für rF7a die Koordinaten von rF7a^{BA}.

III.3.4 Modellbau und Verfeinerung

Die in der Pattersonsuche gefundene Orientierung der Modelle wurde zunächst über eine *rigid-body*-Minimierung des gesamten Moleküls und einzelner Domänen mit dem Programm X-PLOR (Brünger, 1992a) verfeinert. Anschließend wurden mit X-PLOR die Positionen aller Atome durch eine Minimierung des Energieterms verfeinert.

Die weitere Verfeinerung erfolgte durch mehrere Zyklen von manuellem Modellbau der Haupt- und Seitenkettenatome mit Hilfe des Programms MAIN (Turk, 1992) in die 2Fo-Fc - Dichte, gefolgt von weiterer automatischer Positionsverfeinerung in X-PLOR.

Die Inhibitoren 34755 und Benzamidin wurden mit Hilfe des Programms SYBYL (Tripos, St. Louis) erstellt und in die Fo-Fc-Differenzdichte im aktiven Zentrum der Modelle eingefügt.

In späteren Phasen der Verfeinerung wurde der maximum-likelihood Algorithmus (Murshudov et al., 1997) des Programms CNS (Version 0.3, Brünger et al., 1998) angewendet, die B-Faktoren automatisch verfeinert und Solvensmoleküle automatisch positioniert.

Die Geometrie des endgültigen verfeinerten Modells wurde mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993) und WHATCHECK (Hooft et al., 1996) überprüft.

IV ERGEBNISSE

IV.1 Untersuchung von Determinanten für die geringe amidolytische Aktivität von Faktor IXa

IV.1.1 Herstellung, Aufreinigung und Aktivierung der Varianten von rF9a

Alle Untersuchungen zur Aufklärung der katalytischen Eigenschaften von Faktor IXa wurden an rekombinant hergestellten, verkürzten Varianten des Enzyms vorgenommen (des-Gla-des-EGF1-FIXa, rF9a, siehe Kapitel II.4).

Die verschiedenen Punktmutationen in rF9a wurden wie in Material und Methoden beschrieben über PCR-Mutagenese hergestellt. Die Expression, Renaturierung, Aufreinigung, Aktivierung und Titration der Enzyme ist ausführlich in Material und Methoden beschrieben. Die Ausbeuten lagen typischerweise zwischen 10 und 60 mg aktivem Enzym je Liter *E. coli*-Fermentation.

In Abbildung IV-1 ist exemplarisch die Aufreinigung und Aktivierung von rF9a dargestellt.

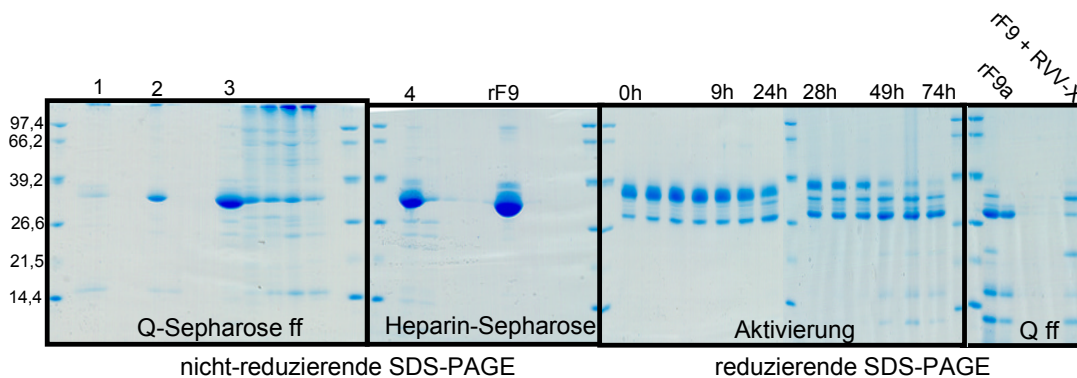


Abbildung IV-1: Aufreinigung von rF9a. Gezeigt sind SDS-PAGE-Gele der verschiedenen Reinigungsschritte. 1, Renaturat; 2, Renaturat nach Aufkonzentration und Dialyse; 3, Hauptpeak der Q-Sepharose; 4, Pool der Q-Sepharose; rF9, Hauptpeak der Heparin-Sepharose; 0h-74h, verschiedene Zeitpunkte der Aktivierung; rF9a, Durchlauf der zweiten Q-Sepharose; rF9+RVV-X, nicht aktivierter rF9 und Schlangengift. Aufgetragen sind jeweils 10µl der entsprechenden Reinigungsstufen.

IV.1.2 Einfluss von Mutationen in der Substratbinderegion auf die Aktivität von rF9a

IV.1.2.1 Untersuchung der S2-S4-Binderegion von rF9a

Die S2-S4-Substratbinderegion in trypsinartigen Serinproteasen wird von einem Insertionsloop um den Rest 99, dem 99-Loop, begrenzt. Dieser Loop ist in FIXa länger und anders angeordnet als in verwandten Proteasen und wird für die besonderen Eigenschaften des Enzyms verantwortlich gemacht.

Anhand gezielter Punktmutationen sollte untersucht werden, welche Bedeutung einzelne Reste des 99-Loops von FIXa auf dessen Spezifität und Reaktivität haben.

Im Fokus der Untersuchungen standen insbesondere die Reste Tyr99 und Lys98.

Rest 99 ist ein Tyrosin in FXa und FIXa, jedoch ein Threonin in FVIIa und PC. Die Kristallstrukturen von porcinem und humanem Faktor IXa (Brandstetter et al., 1995 und Hopfner et al., 1999) hatten darauf hingedeutet, dass die sperrige Seitenkette des Tyr99 den Zugang zur S2- und S4-Tasche in FIXa erschwert und damit für die geringe amidolytische Effizienz des Enzyms verantwortlich ist. Daher wurde der Einfluss von kürzeren Seitenketten (Threonin, Leucin, Alanin) an dieser Position auf die Aktivität des Enzyms untersucht.

Rest 98 ist in den anderen Mitgliedern der FIXa-Genfamilie ein Threonin, in FIXa hingegen ein Lysin. Die lange Seitenkette von Lys98 in FIXa verhindert vermutlich, dass der 99-Loop eine FXa-artige Konformation einnimmt (Hopfner et al., 1999). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Threonin an dieser Position auf die Reaktivität des Enzyms untersucht. Darüber hinaus wurde Rest 98 durch ein Arginin ersetzt (gleiche Ladung aber längere Seitenkette als Lysin), sowie durch ein Methionin (etwas kürzer als Lysin, ungeladen). Die beiden letztgenannten Mutationen sollten Aufschluss darüber geben, inwiefern die Länge bzw. Ladung der Seitenkette in Position 98 die Substratbindung und Reaktivität von FIXa beeinflussen.

In einem weiteren Experiment wurde der 99-Loop um zwei Reste (A95a, A95b) verkürzt. Anhand dieser Mutante sollte untersucht werden, ob nicht die Sequenz, sondern die ungewöhnliche Länge des 99-Loops von FIXa für die niedrige amidolytische Effizienz des Enzyms verantwortlich ist.

Der Einfluss der Mutationen auf die Aktivität von rF9a wurde über zwei verschiedene Methoden bestimmt.

Die amidolytische Aktivität der Enzyme wurde durch die Geschwindigkeit der Hydrolyse eines synthetischen Tripeptidsubstrats gemessen. Als Substrat diente MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA. Substrate des Typs X-Gly-Arg-pNA (X = hydrophobe D-Aminosäure) werden von FIXa und FXa gut gespalten (Castillo et al., 1983).

Zusätzlich wurde die Bindungskonstante für den kompetitiven Inhibitor p-Aminobenzamidin (PABA) gemessen. PABA bindet in die S1-Tasche von trypsinartigen Serinproteasen, und die Bestimmung seiner Bindungskonstante (K_i) kann Aufschluss über veränderte Bindungseigenschaften der Spezifitätstasche geben. Die Messung von K_i erfolgte über die gegenseitige Verdrängung von PABA und MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA. Die kinetischen Parameter konnten aus der Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt werden, die Inhibitionskonstanten für PABA wurde aus dem Sekundärdiagramm des Lineweaver-Burk Diagramms ermittelt (vgl. III.2.4.2). In Tabelle IV-1 sind die kinetischen Parameter für die Hydrolyse von MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA und die Bindungskonstanten für PABA für die Punktmutanten in den Positionen 98 und 99, sowie für die Variante mit dem verkürzten 99-Loop dargestellt.

Tabelle IV-1: kinetische Parameter der Hydrolyse von MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA und Bindungskonstanten für PABA für die rF9a-99Loop-Mutanten.

Enzym	MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA $k_{\text{cat}}/K_m (\text{s}^{-1} \text{M}^{-1})$	PABA $K_i (\mu\text{M})$
rF9a WT	134	201
rF9a Y99L	55	230
rF9a Y99T	33	690
rF9a Y99A	7	561
rF9a K98T	902	123
rF9a K98M	374	119
rF9a K98R	165	230
rF9a Δ A95a/A95b	145	345

Der Austausch von **Tyrosin 99** gegen einen kleineren Rest führte immer zu einer Aktivitätsabnahme. Diese war um so stärker, je kleiner die neue Seitenkette an Position 99 war. Gleichzeitig waren die Bindekonstanten für PABA erhöht, was dafür spricht, dass diese Mutationen auch einen Einfluss auf die S1-Tasche hatten.

Bei Y99L ging die amidolytische Aktivität auf 41% der Wildtypaktivität zurück. Die Zunahme von K_i war vergleichsweise gering, nämlich 15%.

Für Y99T waren die Änderungen stärker: die amidolytische Aktivität betrug nur noch ein Viertel der Ausgangsaktivität, und K_i war um das 3,4-fache erhöht.

Am drastischsten war die Aktivitätsabnahme für Y99A: die Aktivität ging auf 5% zurück, bei einem 2,8-fach erhöhten K_i .

Auch Veränderungen des **Lysin 98** hatten einen deutlichen Einfluss auf die Eigenschaften von rF9a. Insbesondere die Mutation K98T führte zu einer 6,7-fachen Aktivitätszunahme bei einer gleichzeitigen Reduktion von K_i auf 60%. K98M resultierte in 2,8-facher Aktivität und 60%-iger K_i , während K98R keine wesentlichen Änderungen von amidolytischen Eigenschaften und K_i zur Folge hatte. Im Vergleich zu den Mutationen an Position 99 fielen die Auswirkungen auf K_i bei den Mutationen in Position 98 relativ gering aus. Diese Mutationen betrafen demnach in erster Linie die S2-S4-Bindestellen und weniger die S1-Tasche.

Die **Deletion** der beiden Alanine im Loop 99 hatte einen geringfügigen Anstieg der Aktivität sowie eine Zunahme des K_i auf das etwa 1,7-fache zur Folge. Die bloße Länge des 99-Loops hat demnach keinen gravierenden Einfluss auf die Reaktivität von rF9a.

Der starke Effekt der Mutation K98T führte zu der Annahme, dass ein Austausch der langen Lysinseitenkette, welche in FIXa streng konserviert ist, gegen Threonin, welches in den anderen Mitgliedern der FIXa-Genfamilie an Position 98 konserviert ist, es dem 99-Loop von FIXa ermöglicht, eine günstigere Konformation einzunehmen. Diese Vermutung wurde durch einen Vergleich der Strukturen von FIXa und FXa erhärtet (siehe Abbildung IV-2 und Hopfner et al., 1999).

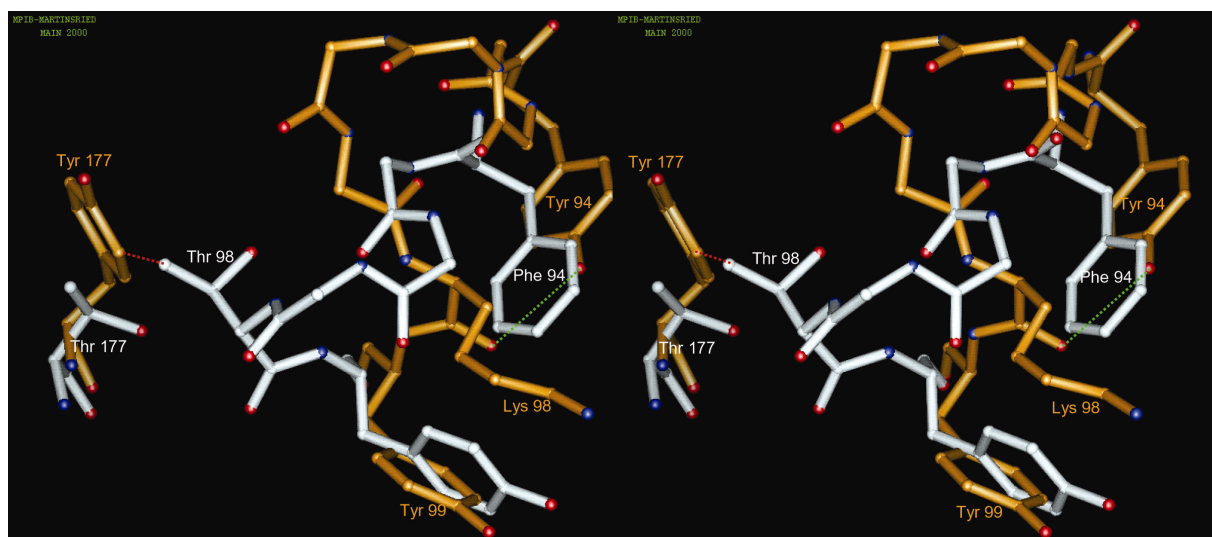


Abbildung IV-2: Überlagerung des 99-Loops von FXa (weiß) und FIXa (orange). Dargestellt sind die Hauptkettenatome, sowie die Seitenketten der Reste 94, 98, 99 und 177. Die rotgepunktete Linie zeigt den sterischen Konflikt zwischen Tyr177 und Thr/Lys98 an, die grüne gepunktete Linie stellt die stabilisierende Wasserstoffbrücke zwischen Tyr94 und Lys98 dar.

Die 99-Loops von FIXa und FXa haben sehr unterschiedliche Konformationen, obwohl die C α -Atome der „äußeren“ Reste Tyr94 und Tyr99 ähnliche Positionen einnehmen. Der unterschiedliche Verlauf der Schleifen wird durch eine Reihe von Elementen bedingt. Dies ist zum einen die Insertion von 2 Resten in den 99-Loop von FIXa. Außerdem wird die FIXa-Konformation des Loops durch eine Wasserstoffbrücke des Carbonyl-Sauerstoff von Lys98 zur Hydroxylgruppe des Tyr94 stabilisiert. Darüber hinaus gäbe es bei einer FXa-ähnlichen Konformation des 99-Loops von FIXa einen sterischen Konflikt zwischen den Seitenketten Tyr177 und Lys98 (beides Threonin in FXa) (siehe Abbildung IV-2). Der unterschiedliche Verlauf der beiden Schleifen verursacht die ungewöhnliche und ungünstige Konformation der Seitenkette von Tyr99 in FIXa.

Die starke Aktivitätszunahme in der Mutante rF9a K98T könnte darauf beruhen, dass der 99-Loop in diesem Enzym eine FXa-ähnliche Konformation einnimmt, da der sterische Konflikt zwischen den Resten 177 und 98 zumindest teilweise abgeschwächt ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen und Überlegungen wurden **Mehrfachmutanten** in rF9a K98T konstruiert. Der „Gegenspieler“ von Rest 98 in der FXa-Konformation, nämlich Rest 177, wurde in ein Threonin umgewandelt und die stabilisierende Wasserstoffbrücke durch die Mutation Y94F entfernt. In der Dreifachmutante rF9a K98T Y94F Y177T sollte gemäß obiger Überlegungen der 99-Loop in eine FXa-artige Konformation umklappen können, was die Seitenkette von Tyr99 ebenfalls in eine günstigere, weniger die Substratbindung störende Konformation bringen sollte. Dies sollte sich in einer weiteren Aktivitätssteigerung bemerkbar machen.

Weiterhin wurden die beiden Mutationen Y94F und Y177T in das Enzym rF9a 99Loop (F10) eingeführt. In diesem Enzym waren die sechs Reste NAAINK des 99-Loops von FIXa gegen die kürzere Sequenz von FXa (TKET) ausgetauscht worden, was zu einer 20-fachen Aktivitätssteigerung im Vergleich zu rF9a geführt hatte (Hopfner, 1997). Die zusätzlichen Mutationen sollten die FXa-Konformation des Loops weiter begünstigen und somit die Aktivität der Mutante erhöhen.

Die Ergebnisse der Untersuchung dieser Mutanten sind in Tabelle IV-2 dargestellt, zusammen mit den entsprechenden Parametern für rF9a 99Loop (F10), rF10a und rF10a 99Loop (F9) (Hopfner, 1997).

Tabelle IV-2: kinetische Parameter der Hydrolyse von MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA und Bindungskonstanten für PABA für rF9a-Mehrfachmutanten

Enzym	MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA			PABA
	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ M ⁻¹)	K _i (μM)
rF9a WT			134	201
rF9a K98T			902	123
rF9a K98T Y94F Y177T			948898	226
rF9a 99Loop (F10) Y94F Y177T	20,21	2,97	6810	129
rF9a 99Loop (F10) ¹	9,9	5,1	1970	117
rF10a WT ¹	182	0,186	983000	60
rF10a 99Loop (F9) ¹	107	6	17800	360

¹Hopfner, 1997

Die Dreifachmutation rF9a K98T Y94F Y177T hatte eine unerwartet starke Wirkung. Die amidolytische Aktivität dieser Mutante ist gegenüber rF9a um mehr als das 7000-fache, sowie gegenüber rF9a K98T um das 1000-fache erhöht und entspricht quasi der Aktivität von rF10a.

Die Veränderung scheint sich hier vor allem auf die S2-S4-Region zu beschränken, da die Bindeeigenschaften für den Inhibitor in S1 verhältnismäßig wenig beeinflusst wurden.

Einen ähnlichen Effekt hatte die Einführung der beiden Mutationen in rF9a 99Loop (F10). Die Aktivität war um das Dreifache gegenüber dem Ausgangskonstrukt verbessert. Die Bindekonstante für PABA blieb auch in diesem Fall weitgehend unbeeinflusst. Auch hier sind die Veränderungen folglich auf den S2-S4-Bereich begrenzt. Die Aktivität von rF9a 99Loop (F10) Y94F Y177T blieb allerdings trotz der Verbesserung deutlich hinter derjenigen der Dreifachmutante (rF9a K98T Y94F Y177T) zurück.

IV.1.2.2 Untersuchung der S1-Tasche von rF9a

Das Glutamat 219 am Rahmen der S1-Tasche von rF9a nimmt eine energetisch ungünstige Konformation ein.

Vorausgegangene Experimente, in denen das Glutamat gegen ein Glycin, den entsprechenden Rest in verwandten Enzymen, ausgetauscht worden war, hatten keine Verbesserung, sondern, im Gegenteil eine Verschlechterung der amidolytischen Eigenschaften von rF9a zur Folge gehabt. Ebenso hatte die Mutation rF10a G219E zu einer massiven Aktivitätsabnahme im Vergleich zu rF10a geführt. Die Bedeutung von Rest 219 für die Integrität und Stabilität der S1-Tasche wurde durch diese Experimente unterstrichen.

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, welche Bedeutung die Salzbrücke der Carboxylgruppe von Glu219 zu Arg148 (porciner FIXa) bzw. Lys224 (rF9a) für die Stabilisierung der S1-Tasche hat. Dazu wurde die negative Ladung der Seitenkette entfernt, indem das Glutamat gegen ein Glutamin ausgetauscht wurde. Die amidolytischen Eigenschaften dieser Mutante sowie die Bindeeigenschaften für den Inhibitor PABA wurden untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle IV-3 dargestellt. Zum Vergleich sind auch die Ergebnisse der zitierten früheren Untersuchungen angegeben (Hopfner, 1997).

Der Einfluss von Rest 190 auf die Aktivität von rF9a wurde ebenfalls untersucht. In trypsinartigen Serinproteasen befindet sich an dieser Position meist ein Alanin oder Serin. Die Seitenkette dieses Restes spielt eine Rolle für die Selektivität für Arginin- oder Lysin-P1 Reste. Die genaue Bedeutung von Serin bzw. Alanin 190 für die Substratspezifität in rF9a, rF10a, Trypsin und rXYa wird in Kapitel IV.4.2 beschrieben.

Die amidolytische Aktivität und Inhibitorbindung der Mutante S190A im Vergleich zum Wildtyp sind in Tabelle IV-3 angegeben.

Tabelle IV-3: kinetische Parameter der Hydrolyse von MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA und Bindungskonstanten für PABA für die rF9a-S1-Mutanten

Enzym	MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1} \text{M}^{-1}$)	PABA K_i (μM)
rF9a WT	134	201
rF9a S190A	158	366
rF9a E219Q	83	246
rF9a E219G ¹	51	900
rF10a WT ¹	983000	60
rF10a G219E ¹	960	8200

¹Hopfner, 1997

Die Aktivität von rF9a E219Q ist gegenüber rF9a um ein Drittel reduziert, K_i ist um ein Fünftel höher. Die Entfernung der Salzbrücke hat demnach einen leichten, jedoch nicht gravierenden Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften von rF9a. Allerdings kann auch die veränderte Seitenkette immer noch mit den Seitenketten von Lys224 interagieren, nur nicht mehr über eine Salz-, sondern über eine Wasserstoffbrücke. Die aus der Abschwächung der Interaktion resultierende leichte Destabilisierung der S1-Tasche wird in der moderaten Verschlechterung der kinetischen Parameter deutlich.

Die Mutation S190A hatte nur einen sehr geringen Einfluss auf die katalytische Aktivität von rF9a; die Bindekonstante für den Inhibitor war um 82% erhöht. Die schlechtere Bindung des Inhibitors ist in Übereinstimmung damit, dass durch die Mutation S190A eine Wasserstoffbrücke für die Bindung von PABA in die S1-Tasche wegfällt.

IV.1.3 Einfluss der Mutationen in der Substratbinderegion auf die Selektivität von rF9a

Die hohe Substratselektivität der Gerinnungsproteasen zählt zu ihren wesentlichen Eigenschaften, die für einen kontrollierten Ablauf der Gerinnung unabdingbar sind. Die eingeführten Mutationen in und um den 99-Loop sowie in die S1-Tasche von rF9a betreffen die Substratbindungsregion des Enzyms. Abgesehen von einer Wirkung auf die amidolytischen Eigenschaften sollten diese Mutationen daher auch einen Effekt auf die Substratselektivität von rF9a haben.

Der Einfluss der Mutationen auf die Substratspezifität von rF9a wurde anhand der katalytischen Effizienz gegenüber zwei amidolytischen Substraten untersucht, von denen eines (MS-D-Phe-Gly-Arg-pNA [B]) bevorzugt von rF9a, das andere (MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA [A]) bevorzugt von rF10a gespalten wurde.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle IV-4 zusammengefasst.

Tabelle IV-4: Vergleich von k_{cat}/K_m der rF9a-Mutanten für die Substrate MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA (A) und MS-D-Phe-Gly-Arg-pNA (B). Die Selektivität ist durch den Quotienten der k_{cat}/K_m -Werte A/B gegeben.

Enzym	A	B	Selektivität
	k_{cat}/K_m ($s^{-1} M^{-1}$)		A/B
rF9a WT	134	159	0,85
rF9a Y99L	55	74	0,74
rF9a Y99T	33	22	1,49
rF9a Y99A	7	9	0,72
rF9a K98R	165	120	1,37
rF9a K98M	374	236	1,58
rF9a K98T	902	433	2,08
rF9a K98T Y94F Y177T	948898	490546	1,93
rF9a 99Loop (F10) Y94F Y177T	6810	4243	1,60
rF9a 99Loop (F10) ¹	1970	1640	1,20
rF10a WT ¹	983000	390000	2,52
rF10a 99Loop (F9) ¹	17800	10200	1,75
rF9a del A95a/A95b	145	181	0,80
rF9a E219Q	83	111	0,75
rF9a S190A	158	105	1,50

¹Hopfner, 1997

Die eingeführten Mutationen hatten unterschiedliche Auswirkungen auf die Substratspezifität. Die deutlichsten Änderungen waren bei den an Position 98 veränderten Enzymen zu verzeichnen: je stärker die Aktivität zunahm, desto stärker änderte sich bei diesen Konstrukten auch die Selektivität in Richtung derjenigen von rF10a. Die stärksten Selektivitätsänderungen wurden in den Varianten rF9a K98T, rF9a K98T Y94F Y177T sowie rF9a 99-Loop (F10) Y94F Y177T erreicht. Diese Selektivitätsänderungen sprechen zusätzlich zu der beobachteten Aktivitätssteigerung dafür, dass die eingebauten Mutationen die Konformation des 99-Loops in Richtung derjenigen von FXa beeinflussen. In FXa ist die hydrophobe S4-Bindetasche durch den Verlauf des 99-Loops enger als in FIXa, was die Präferenz für das etwas kleinere Norleucin gegenüber der Phe-Seitenkette des Substrats in FXa erklärt.

Die Mutagenese von Rest 99 hatte keinen einheitlichen Effekt auf die Substratspezifität: in zwei Fällen (Y99L und Y99A) entsprach die Selektivität weiterhin derjenigen von rF9a, bei Y99T lag sie zwischen rF9a und rF10a.

Die Verkürzung des 99-Loops um zwei Reste blieb ohne Auswirkung auf die Substratspezifität von rF9a.

Die beiden Mutationen in der S1-Tasche wirkten sich unterschiedlich auf die Selektivität aus: E219Q verursachte zwar eine Aktivitätsabnahme, jedoch keine Spezifitätsänderung, während die Mutation S190A zwar keinen großen Effekt auf die Aktivität hatte, jedoch die Spezifität in Richtung derjenigen von rF10a veränderte.

IV.1.4 Wechselwirkung von Ethylenglycol mit dem 99-Loop

Ethylenglycol und eine Reihe anderer Alkohole stimulieren die Aktivität von FIXa und FVIIa, nicht jedoch von FXa (Neuenschwander et al., 1993, Stürzebecher et al., 1997). Stürzebecher et al. (1997) hatten vorgeschlagen, dass die Alkohole einen spezifischen Effekt auf die Konformation des 99-Loop von FIXa ausüben mit dem Ergebnis, dass die Substratbindung insbesondere in die S3/S4-Tasche nicht mehr durch die Seitenkette des Tyr99 behindert wird. In FXa verläuft der 99-Loop anders als in FIXa. Tyr99 nimmt eine andere Position ein und behindert zwar die Bindung von Substratseitenketten in S2, nicht jedoch die kanonische Bindung der Hauptkette eines geeigneten Substrats. In FXa ist auch keine Stimulation durch Ethylenglycol festzustellen.

Wenn der Effekt von Ethylenglycol auf einer Reorientierung des 99-Loops beruht, dann sollten die oben beschriebenen Mutanten im 99-Loop ebenfalls eine veränderte Sensibilität gegenüber Ethylenglycol zeigen.

Aus diesem Grund wurden einige Mutanten und chimären Enzyme ausgewählt und der Effekt verschiedener Konzentration von Ethylenglycol auf die Hydrolyse von zwei verschiedenen Tripeptidsubstraten (Substrate A und B, vgl. Tabelle IV-5) untersucht. Die untersuchten Enzyme waren: rF9a, rF9a 99Loop (F10), rF9a K98T Y94F Y177T, rF10a, rF10a 99Loop (F9). Die Anfangsgeschwindigkeiten der Substrathydrolyse wurden in Gegenwart verschiedener Konzentrationen von Ethylenglycol im amidolytischen Assay bestimmt. In Abbildung IV-3 sind die Aktivitätsänderungen in Abhängigkeit von der Ethylenglycolkonzentration, normiert auf die jeweilige Ausgangsaktivität, dargestellt; in Tabelle IV-5 sind im Überblick die optimalen Ethylenglycolkonzentrationen und die maximalen Aktivitätssteigerungen zusammengefasst.

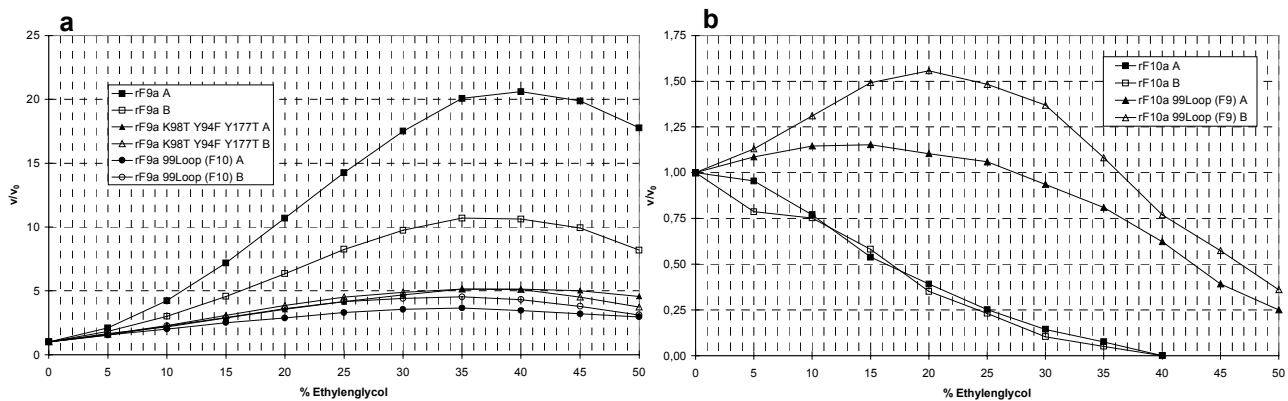


Abbildung IV-3: Einfluss der EG-Konzentration auf die Geschwindigkeit der Hydrolyse zweier Tripeptidsubstrate (MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA (A) und MS-D-Phe-Gly-Arg-pNA (B)) bei verschiedenen rF9a- (a) und rF10a- (b) Varianten.

Tabelle IV-5: optimale EG-Konzentrationen und maximale Aktivitätssteigerungen einiger rF9a- und rF10a-Varianten für die Hydrolyse zweier Tripeptidsubstrate (MOC-D-Nle-Gly-Arg-pNA (A) und MS-D-Phe-Gly-Arg-pNA (B)).

Enzym	Substrat	%EG	v/v_0
rF9a	A	35	20,6
	B	40	10,7
rF9a K98T Y94F Y177T	A	35	5,1
	B	35	5,1
rF9a 99Loop (F10)	A	35	3,7
	B	35	4,5
rF10a	A	0	1,0
	B	0	1,0
rF10a 99Loop (F9)	A	15	1,2
	B	20	1,6

Die untersuchten rF9a-Varianten zeigten eine stark reduzierte Sensibilität der Aktivität gegenüber Ethylenglycol. Die maximale Stimulation wurde jeweils bei etwa 35% EG erreicht. Interessanterweise war die Aktivitätssteigerung für beide Substrate in den Mutanten etwa gleich groß, während in rF9a die Steigerung für Substrat A doppelt so hoch ausfiel wie für Substrat B.

rF10a wurde durch die Zugabe von Ethylenglycol inhibiert, bei 40% war keine Aktivität mehr messbar. Im Gegensatz dazu war bei der Mutante rF10 99Loop (F9) eine leichte Stimulation der Aktivität zu beobachten, welche ihr Maximum bei 15% bzw. 20% EG erreichte. Bei Konzentrationen oberhalb von 27% (Substrat A) bzw. 37% (Substrat B) setzte eine inhibitorische Wirkung ein.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in der Tat die Wirkung des Ethylenglycols auf eine Beeinflussung des 99-Loops zurückzuführen ist, da Mutationen in diesem Bereich die Stimulierbarkeit durch EG verändern.

IV.2 Etablierung eines Renaturierungsverfahrens für rekombinanten Faktor VII

Die genauen Abläufe im Rückfaltungsprozess komplexer Proteine sind weitgehend unverständlich. Die geeigneten Rückfaltungsbedingungen für ein gegebenes Protein können daher auch nur sehr begrenzt durch Vergleich mit verwandten Proteinen vorhergesagt werden und müssen empirisch ermittelt werden.

Es gibt allerdings bestimmte Bedingungen, vor allem 0,5 M Arginin und pH 8.5, die sich durch eine hohe Erfolgswahrscheinlichkeit auszeichnen (Armstrong et al., 1999; de Bernandez Clark et al., 1999).

Das *Standardprotokoll* für die Rückfaltung von rF9, rF10, rTrypsin, rXY sowie zahlreicher Mutanten und Chimären dieser Enzyme basiert ebenfalls auf der förderlichen Wirkung von Arginin und leicht alkalischem pH-Wert (siehe Tabelle IV-6).

Tabelle IV-6: Standardprotokoll für die Renaturierung rekombinanter Gerinnungsproteinasen¹

Solubilisierung	Entfernung des Redoxsystems	Renaturierung
6 M GdmCl	55% GdmCl	0.5 M L-Arginin
150 mM GSSG	20 mM EDTA	50 mM Tris
15 mM GSH	pH 5 (4°C)	20 mM CaCl ₂
20 mM EDTA		1 mM EDTA
100 mM Tris		0,5 mM Cystein
pH 8.2 (RT)		pH 8.5 (4°C)

¹: Kopetzki et al., 1997

Da Faktor VII mit den genannten Enzymen eine hohe Homologie aufweist, wurde zunächst versucht, geeignete Rückfaltungsbedingungen für des-Gla-des-EGF1-Faktor VII (rF7) durch Variation des Standardprotokolls zu ermitteln.

In den ersten Versuchsreihen wurden vornehmlich der pH-Wert und die chaotropen Additive variiert.

Die IBs wurden nach Standard solubilisiert und dialysiert und die Renaturierung in den verschiedenen Puffern im 10ml-Maßstab getestet. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen, dialysiert und der lösliche Überstand nach Aufkonzentrierung mittels TCA-Fällung auf nichtreduzierenden SDS-Gelen und per Western-Blot-Analyse auf Anwesenheit von monomerem rF7 untersucht.

In keiner der untersuchten Bedingungen war richtig gefalteter rF7 nachweisbar.

Im Folgenden wurde die Strategie zum Auffinden passender Renaturierungsbedingungen auf eine Reihe von Varianten von Faktor VII ausgedehnt, und außerdem neben pH-Wert und chaotropen Agenzien auch andere Pufferbestandteile, das Redoxpotential, Inkubationstemperatur und die Dauer der Renaturierung variiert.

IV.2.1 Herstellung verschiedener Chimären und Konstrukte von rF7

Es wurden eine Reihe von Varianten und Chimären von rF7 hergestellt und in den Renaturierungsexperimenten parallel bearbeitet. Eine Übersicht der Konstrukte ist in Abbildung IV-4 gegeben.

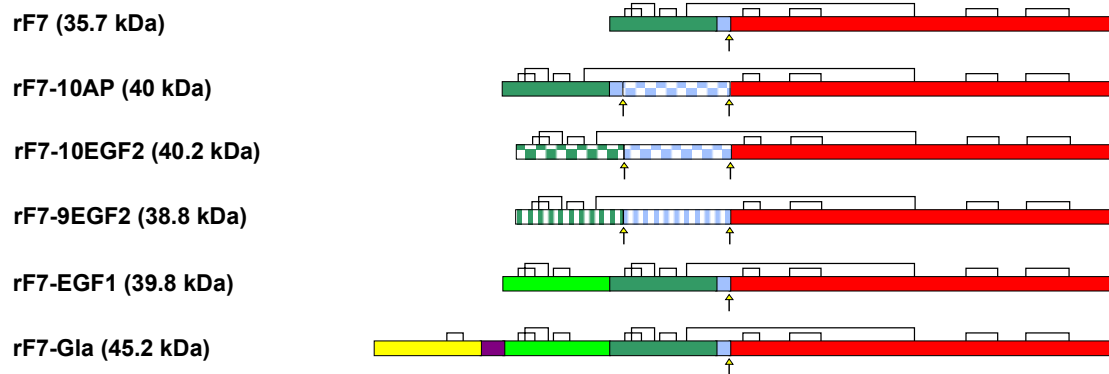


Abbildung IV-4: Schematische Darstellung der Domänenzusammensetzung der Varianten von rF7. Die Domänen sind als farbige Kästchen mit aufgesetzten Disulfidbrücken dargestellt, die Spaltstellen für die Aktivierung sind durch Pfeile gekennzeichnet. Gelb, Gla-Domäne; lila, AS; hellgrün, EGF1; dunkelgrün, EGF2; blau, Aktivierungspeptid; rot, katalytische Domäne. Ausgefüllte Kästchen, FVII-Ursprung; kariert, FX-Ursprung; gestreift, FIX-Ursprung.

IV.2.1.1 Verlängerung des Aktivierungspeptids von rF7

Ein augenfälliger Unterschied zwischen Faktor VII einerseits und den Faktoren IX und X andererseits besteht in der unterschiedlichen Länge des Aktivierungspeptids. Während bei FIX und FX ein 39 bzw. 55 Aminosäuren langes Peptid die EGF2- und katalytische Domäne verbindet und bei der Reifung bzw. Aktivierung der Enzyme abgespalten wird, ist dieser Linker bei FVII lediglich 10 Aminosäuren lang. Dieses kurze Aktivierungspeptid wird auch nicht abgespalten, sondern es erfolgt bei der Aktivierung nur ein einziger Schnitt, durch den der neue N-Terminus der katalytischen Domäne freigesetzt wird.

Es ist nicht bekannt, ob die beiden Domänen (EGF2 und CD) von rF9 und rF10 während der Renaturierung unabhängig voneinander falten, oder ob sie von Anfang an in engem Kontakt miteinander stehen. Für den Fall, dass sie sich für eine effiziente Faltung zunächst relativ frei bewegen können müssen, könnte es von Nachteil sein, wenn ihre Beweglichkeit gegeneinander durch einen zu kurzen Linker eingeschränkt ist. Aus diesem Grunde wurde eine rF7-Variante konstruiert, in die das längere FX-Aktivierungspeptid eingefügt wurde (rF7-10AP). Die Übergänge wurden so gewählt, dass das eingefügte Peptid bei der Aktivierung von rF7-10AP vollständig herausgespalten wird und das reife Enzym dem ursprünglich geplanten rF7a entspricht.

IV.2.1.2 Chimären verschiedener Gerinnungsenzyme

In der Zelle wird die Faltung von Polypeptidketten durch Chaperone katalysiert. Für die *in vitro* Naturierung von Proteinen sind eine Reihe von Beispielen beschrieben, in denen die Ausbeute durch die Anwesenheit von hydrophilen Fusionsproteinen oder intramolekularen Chaperonen, wie z. B. bereitwillig faltenden Domänen oder Propeptiden, gesteigert werden kann (für einen Überblick siehe z.B. de Bernadez Clark, 1999).

Im vorliegenden Fall ist die wesentliche Domäne, welche hergestellt werden sollte, die katalytische Domäne von FVII. Die EGF2-Domäne in rF7 sollte die katalytischen Domäne durch Maskierung der hydrophoben Domänenkontaktfläche stabilisieren, ist jedoch für eine kristallographische Untersuchung der Bindung niedermolekularer Inhibitoren in das aktive Zentrum entbehrlich.

Es ist möglich, dass die beiden Domänen unterschiedlich gut falten und eine der Domänen die Faltung der anderen begünstigt. Weiterhin ist möglich, dass die besser faltende Domäne die EGF2-Domäne ist (genauso gut möglich ist allerdings auch, dass die katalytische Domäne besser faltet), und dass die EGF2-Domäne von FVII weniger gut faltet, als diejenige von FIX oder FX. Für diesen Fall wurden chimäre Proteine, bestehend aus der EGF2-Domäne von FIX bzw. FX und der katalytischen Domäne von FVII konstruiert (rF7-9EGF2 und rF7-10EGF2). Sollte die heterologe EGF2-Domäne besser falten als die von FVII, so könnte sie die katalytische Domäne in Lösung halten und durch Bereitstellung einer „Schablone“ für die hydrophobe Seite der katalytischen Domäne deren Faltung begünstigen. Eine Überlagerung der bekannten Kristallstrukturen der drei Enzyme zeigte, dass insbesondere an der hypothetischen Kontaktfläche zwischen FX-EGF2 und FVII-CD keine sterischen Konflikte zu erwarten wären; die Kontaktfläche zwischen FIX-EGF2 und FVII-CD ist etwas weniger gut konserviert, jedoch wäre auch hier, eine gewisse Flexibilität vorausgesetzt, eine erfolgreiche Fusion denkbar. Das Konstrukt rF7-9EGF2 wurde insbesondere auch hergestellt, weil die Ausbeute der Rückfaltung von rF9 über derjenigen von rF10 liegt. Sollte die diesen Konstrukten zugrundeliegende Arbeitshypothese sich als korrekt erweisen und die Faltung durch die EGF2-Domäne vorangetrieben werden, so könnte die höhere Renaturierungseffizienz von rF9-EGF2 den negativen Einfluss einer nicht optimalen Domänenkontaktfläche überkompensieren.

IV.2.1.3 Verlängerung von rF7

Die N-terminalen Domänen eines Proteins entstehen zuerst und müssen daher auch evtl. in der Lage sein, unabhängig vom Rest des noch in der Entstehung begriffenen Proteins ihre richtige Konformation zu finden. Sind diese Domänen richtig gefaltet, so können sie einerseits die Löslichkeit der gesamten Polypeptidkette erhöhen, andererseits auch als intramolekulare Chaperone für die nachfolgenden Domänen dienen. Für den Fall, dass diese Überlegungen für FVII zutreffen, wurden zwei weitere Varianten kloniert, die zusätzlich die EGF1 bzw. EGF1 und Gla-Domäne von FVII besaßen (rF7-EGF1 und rF7-Gla).

IV.2.1.4 Suche nach geeigneten Renaturierungsbedingungen für rF7

Mit allen sechs Konstrukten wurde eine Vielzahl potentieller Renaturierungspuffer getestet. In Tabelle IV-7 sind die verschiedenen gegeneinander variierten Bedingungen und Zusätze im Überblick dargestellt.

Tabelle IV-7: Überblick über die gegeneinander variierten Bedingungen zur Ermittlung eines Naturierungsverfahrens für die rF7-Varianten

physikalische Parameter	Denaturantien	Salze	Additive	Redoxsystem
pH 7-11	0-1 M L-Arginin	0-0,5 M NaCl	0-20% Glycerin	gemischte Disulfide (GSSG/GSH, verschiedene Konzentrationen) während der Solubilisierung, reduzierende Bedingungen (Cystein) während der Naturierung umgekehrt
4-25°C	0-0,5 M L-Lysin	0-0,5 M	0-20% Sucrose	
4-30 Tage	0-2,5 M Tris	(NH ₄) ₂ SO ₄	0-10% Ethylenglycol	
	0-3 M Triethanolamin	0-5 M Na ₂ SO ₄ 20 mM CaCl ₂ 0-1 mM EDTA	0-20% Octylglucosid Faktor Xa Benzamidin	

In der Gegenwart von hohen Konzentrationen an Ethylenglycol und Arginin waren erstmalig Banden der erwarteten Größe im SDS-Gel und Western-blot zu erkennen. Weiterhin wurde deutlich, dass die Renaturierung bei einer mittleren Temperatur von 15°C am besten war und ein pH-Wert von 8-9 bevorzugt wurde.

Es wurde auch untersucht, bei welchem Dialysepuffer nach der Renaturierung am meisten Protein in Lösung blieb. Der optimale Puffer hier war 20mM Tris, pH 8.5 (bei RT), 5mM CaCl₂ und wurde in allen nachfolgenden Experimenten für die Dialyse der Renaturate verwendet.

IV.2.1.5 Optimierung der anfänglichen Renaturierungsbedingungen

Die in den ersten Versuchsreihen gefundenen erfolgversprechenden Bedingungen (insbesondere hohe Konzentrationen von Arginin und Ethylenglycol) wurden in den folgenden Experimenten weiter aufgefächert und optimiert.

IV.2.1.5.1 Optimierung der Arginin- und Ethylenglycolkonzentration für die verschiedenen Konstrukte

Verschiedene Konzentrationen an Ethylenglycol (im folgenden kurz EG) und Arginin wurden gegeneinander variiert, um die für die verschiedenen Konstrukte optimalen Renaturierungsbedingungen zu ermitteln.

Der „Grundpuffer“ wurde bei diesen Experimenten konstant gehalten und ähnelte dem in Tabelle IV-6 aufgelisteten Standardpuffer: 50mM Tris, 20mM CaCl₂, 1mM EDTA, Zugabe von 0,5mM Cystein x H₂O bei jedem Puls, pH 8.5, 15°C.

Die optimalen Arginin- und EG-Konzentrationen für die verschiedenen Konstrukte sind in Tabelle IV-8 zusammengefasst.

In Abbildung IV-5 sind die Ausbeuten für die verschiedenen Konstrukte mit dem jeweils optimalen Puffer gegenübergestellt.

Tabelle IV-8: optimale Arginin- und Ethylenglycolkonzentrationen für die verschiedenen Konstrukte

Konstrukt	Arginin	Ethylenglycol
rF7	1 M	40%
rF7-10AP	1 M	30%
rF7-10EGF2	1 M	20%
rF7-9EGF2	0,9 M	20%
rF7-EGF1	1 M	20%
rF7-Gla	1 M	20%

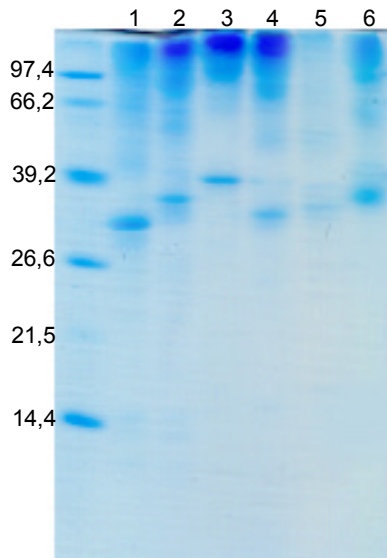


Abbildung IV-5: Renaturierung der verschiedenen Konstrukte mit den optimalen Puffern (Tabelle IV-8). Es wurde jeweils ein Puls Solubilisat zu einer Proteinkonzentration von 0,5mg/ml, sowie Cystein ad 0,5mM zugegeben. Nach einer Woche Inkubation bei 15°C wurde erneut Cystein zugegeben nach weiteren 10 Tagen ein Aliquot dialysiert. Der lösliche Überstand wurde über TCA-Fällung aufkonzentriert und auf nichtreduzierenden SDS-PAGE-Gelen analysiert. Die aufgetragene Menge entspricht dem Protein aus 400µl Renaturat, also ursprünglich 400µg solubiliertes Protein. 1, rF7 (35,7 kDa); 2, rF7-10AP (40 kDa); 3, rF7-10EGF2 (40,2 kDa); 4, rF7-9EGF2 (38,8 kDa); 5, rF7-EGF1 (39,8 kDa); 6, rF7-Gla (45,2 kDa).

Die Renaturierungsausbeuten mit den optimierten Bedingungen waren für die verschiedenen Konstrukte unterschiedlich gut.

Die besten Ergebnisse konnten mit dem Ausgangskonstrukt, rF7, erzielt werden. Ähnlich gut war die Ausbeute mit rF7-10EGF2, gefolgt von rF7-10AP und rF7-9EGF2. Die längeren Konstrukte ließen sich am schlechtesten renaturieren.

Auffällig ist die unterschiedliche „Schärfe“ der Monomerbanden im SDS-Gel. Bei rF7, rF7-10EGF2 und rF7-10AP ist diese Monomerbande scharf abgegrenzt, bei den anderen drei Konstrukten ist sie mehr oder weniger stark verschwommen. Dies deutet darauf hin, dass diese Bande hier aus einer Vielzahl von Monomeren mit unterschiedlicher Konformation zusammengesetzt ist. Diese unterschiedlichen Konformationen müssen von verschiedenen Disulfidverbrückungen herrühren, denn alle anderen nichtkovalenten Strukturen der Proteine werden durch die Anwesenheit von SDS im Gel zerstört. Die kovalenten Disulfidverbrückungen hingegen führen dazu, dass die Polypeptidkette eine mehr oder weniger globuläre Konformation beibehält und so mehr oder weniger schnell durch die Polyacrylamidmatrix wandern kann.

Der Anteil an richtig gefaltetem Protein beträgt in diesen Fällen somit nur einen Bruchteil der in Lösung gebliebenen Monomere.

Die scharfe Bande bei rF7, rF7-10EGF2 und rF7-10AP zeigt ein einheitliches Laufverhalten und somit eine einheitliche Disulfidverbrückung an. Eine einheitliche Disulfidverbrückung bedeutet, dass diese Konformation energetisch bevorzugt ist und mit hoher Wahrscheinlichkeit der nativen Struktur entspricht. Zur Überprüfung der richtigen Konformation des Proteins musste zunächst die Ausbeute des Verfahrens weiter gesteigert werden, um dann ausreichend Material für eine Aufreinigung und Aktivierung herstellen zu können.

Es wurde nun nur noch mit dem ursprünglichen Konstrukt, rF7, weitergearbeitet, da dieses die beste Renaturierungsausbeute hatte und die gewünschten Eigenschaften (verkürzte Form von FVII) besaß. Bei den übrigen Konstrukten wurde weder versucht, die Renaturierung weiter zu verbessern, noch, die Enzyme aufzureinigen und zu aktivieren.

IV.2.1.5.2 Optimierung weiterer Parameter der Renaturierung von rF7

Für eine weitere Steigerung der Renaturierungsausbeute wurden der Einfluss der Cysteinkonzentration sowie die Bedeutung der Abstände zwischen den Pulsen untersucht und verschiedene Konzentrationen von Arginin und Ethylenglycol gegeneinander variiert. Weiterhin wurde untersucht, ob Polyethylenglycol ebenfalls einen positiven Effekt auf die Renaturierung von rF7 hat.

Der Grundpuffer war, soweit nicht anders angegeben, 50mM Tris, 20mM CaCl₂, 1mM EDTA, pH 8.5 bei 15°C. In den Ansätzen 1-18 und 30-33 wurde zweimal Cystein zugegeben, nämlich 0,5mM am ersten Tag zusammen mit dem Solubilisatpuls und 2mM an Tag 8. Bei jedem Puls wurden 0,2mg/ml Protein zugegeben.

Es wurden über einen Zeitraum von 13 Tagen zu verschiedenen Zeitpunkten Gelproben entnommen, dialysiert, der Überstand mit TCA-Fällung aufkonzentriert und auf nichtreduzierenden SDS-PAGE-Gelen analysiert. Darüberhinaus wurde der Verlauf der Cysteinkonzentration in den verschiedenen Ansätzen mittels des Ellmann-Tests verfolgt.

Eine Übersicht über diese Versuchsreihe ist in Tabelle IV-9 gegeben.

Tabelle IV-9: Optimierung der Cysteinkonzentration und Pulsabstände für die Renaturierung von rF7

Ansatz	M Arg	% EG	sonstiges	Ansatz	M Arg	% EG	sonstiges
1	0,4	40		19	1,0	40	0,1 mM Cystein
2	0,6	40		20	1,0	40	0,5 mM Cystein
3	0,8	40		21	1,0	40	1 mM Cystein
4	1,0	40		22	1,0	40	5 mM Cystein
5	1,2	40		23	1,0	40	10 mM Cystein
6	0,6	40	pH 9,0	24	0,6	40	5 Pulse, alle 2 h
7	0,6	50		25	0,6	40	5 Pulse, täglich
8	0,6	60		26	0,6	40	5 Pulse, alle 2 Tage
9	0,6	70		27	1,0	40	5 Pulse, alle 2 h
10	1,0	40	pH 9,0	28	1,0	40	5 Pulse, täglich
11	1,0	50		29	1,0	40	5 Pulse, alle 2 Tage
12	1,0	60		30	0,6	40	4°C
13	1,0	70		31	1,0	40	4°C
14	1,0		0,01% PEG 3500	32	0,6	40	Leerwert, kein Protein
15	1,0		0,05% PEG 3500	33	1,0	40	Leerwert, kein Protein
16	1,0		0,1% PEG 3500				
17	1,0		0,5% PEG 3500				
18	1,0		1,0% PEG 3500				

In Abbildung IV-6 ist das Ergebnis dieses Optimierungsexperimentes im Überblick dargestellt. Aufgetragen sind Proben aller Renaturierungsansätze nach Ablauf der 13 Tage, Dialyse und Aufkonzentration der löslichen Fraktion durch TCA-Fällung. Die Proteinmenge in jeder Gelspur entspricht dem Überstand aus 400µl Renaturat. Die Proteinmenge in den Renaturierungsansätzen 1-23 und 30-31 war identisch (0,2mg/ml); in den Ansätzen 24-29 war am Ende des Experiments die fünffache Menge zugegeben worden (1mg/ml). Bei der Auswertung der

Renaturierungseffizienz anhand der nichtreduzierenden SDS-PAGE-Gele müssen daher diese Reihen getrennt betrachtet werden.

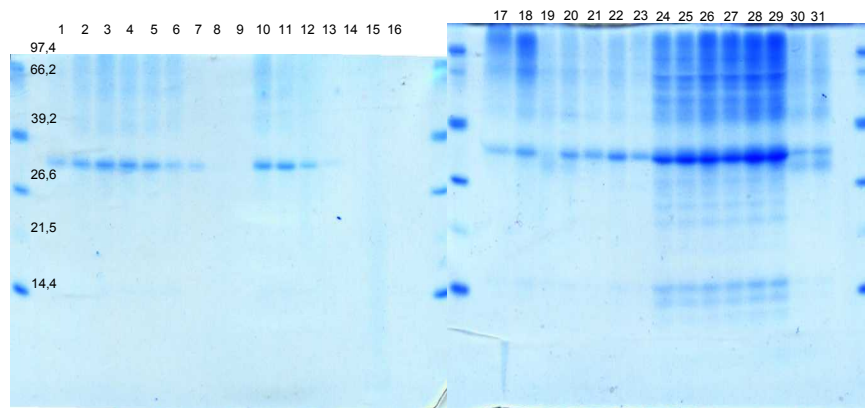


Abbildung IV-6: Optimierung der Arginin-, Ethylenglycol-, Cystein- und Proteinkonzentration für die Renaturierung von rF7. Beschreibung siehe Text und Tabelle IV-9.

IV.2.1.5.2.1 Optimierung der Pufferzusammensetzung

In den Ansätzen 1-5 wird der Einfluss steigender Argininkonzentrationen bei gleichbleibend hoher Ethylenglycolkonzentration sichtbar. Am meisten Protein blieb bei 0,8 und 1 M Arginin in Lösung.

Die Reihen 6-9 und 10-13 verdeutlichen, dass eine Steigerung der Ethylenglycolkonzentration über 40% hinaus unabhängig von der Argininkonzentrationen keine weitere Verbesserung der Renaturierungseffizienz mit sich bringt, sondern im Gegenteil wieder weniger Protein in Lösung bleibt. Somit bleibt 40%, wie in den Vorversuchen ermittelt (nicht gezeigt), die optimale Konzentration an Ethylenglycol für die Renaturierung von rF7.

In den Ansätzen 2 und 6 sowie 4 und 10 wurde der Einfluss leicht unterschiedlicher pH-Werte auf die Renaturierungseffizienz verglichen. Die Unterschiede waren marginal, sodass kleinere Schwankungen im pH-Wert wohl nicht über Erfolg oder Misserfolg der Renaturierung entscheiden. Bei höheren pH-Werten wird jedoch der Redox-Katalysator Cystein schneller verbraucht, was sich negativ auf das Renaturierungsergebnis auswirkt (siehe unten). Der pH-Wert von 8,5 aus den Vorversuchen wurde im endgültigen Renaturierungspuffer beibehalten. Reihe 14-18 zeigt, dass nicht nur das Monomer Ethylenglycol, sondern auch das Polymer PEG 3500 die Renaturierung von rF7 begünstigt. Bereits bei einer Konzentration von 0,5-1% war eine Renaturierung sichtbar, jedoch mit einem großen Aggregatanteil einhergehend. Die Renaturierung in Gegenwart von PEG wurde nicht weiter optimiert, da das kleinere Ethylenglycol später leichter durch Dialyse abzutrennen ist.

IV.2.1.5.2.2 Optimierung der Cysteinkonzentration

Der Einfluss der Cysteinkonzentration auf die Renaturierung von rF7 wurde in den Versuchen 19-23 untersucht. Die Cysteinkonzentration in Ansatz 19 (0,1mM) war quasi sofort aufgebraucht (siehe Abbildung IV-7), und in diesem Ansatz war keine Renaturierung zu beobachten. Bei den mittleren Cysteinkonzentrationen (0,5, 1 und 5mM) war die Ausbeute vergleichbar gut, bei 10mM war sie wieder geringer. Vermutlich war hier der Puffer zu stark reduzierend, sodass auch korrekt gebildete, also energetisch eigentlich vorteilhafte Disulfidbrücken ständig wieder gelöst wurden. Die Cysteinkonzentration war in diesem Ansatz auch zum Ende des Experiments immer noch recht hoch (2,5mM). Eine längere Inkubationszeit (und damit abfallende Cysteinkonzentration) hätte vermutlich auch hier die Ausbeute weiter erhöht.

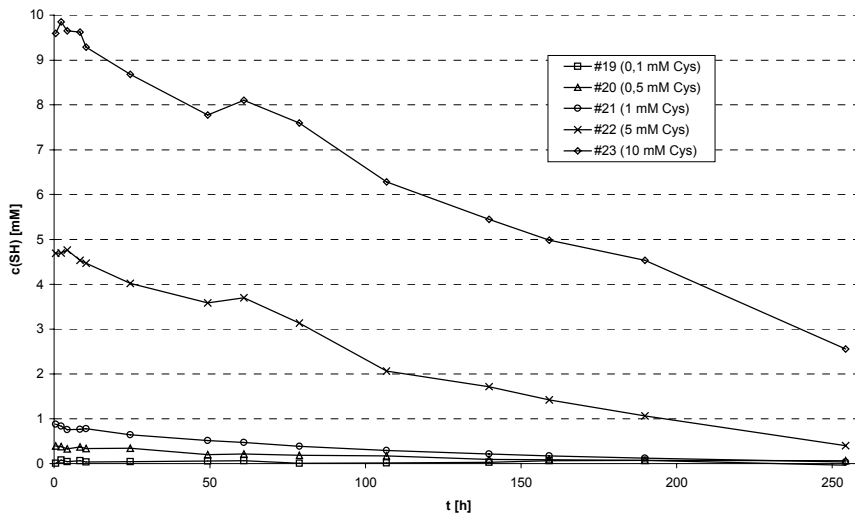


Abbildung IV-7: Zeitverlauf der SH-Konzentration in den Ansätzen 19-23. Beschreibung siehe Text.

Der Zeitverlauf der Renaturierung in Abhängigkeit von der Cysteinkonzentration verdient besondere Beachtung.

In den meisten Renaturierungsansätzen wurde zugleich mit der Zugabe von Protein auch Cystein bis zu einer Endkonzentration von 0,5mM zugegeben. Die Konzentration an freien SH-Gruppen wurde mittels des Ellman-Tests in regelmäßigen Abständen verfolgt. Die Geschwindigkeit, mit der die SH-Gruppen verbraucht wurden, war unabhängig von Pufferzusammensetzung oder Anwesenheit von Protein und hing in erster Linie von der Oxidation durch eingerührten Sauerstoff ab. Bereits nach wenigen Tagen waren die SH-Gruppen weitgehend aufgebraucht. Nach einer Woche wurde erneut Cystein zugegeben, zu einer rechnerischen Endkonzentration von 2mM, und für eine weitere Woche die Renaturierung und Verlauf der SH-Konzentration verfolgt. Exemplarisch ist hier der Zeitverlauf für Ansatz 4 gezeigt (Abbildung IV-8).

Die Renaturierung ist nach 3-4 Tagen abgeschlossen, einhergehend mit einer SH-Konzentration von etwa 0,1mM. Im Bereich der richtigen Monomergröße für rF7 ist auf dem nichtreduzierenden SDS-Gel eine Doppelbande zu erkennen. Nach erneuter Cysteinzugabe verschwindet die untere Bande der Doppelbande, die obere nimmt zu. Gleichzeitig nehmen auch weiter oben laufende Banden ab, die vermutlich Dimere dargestellt hatten. Eine erneute Zugabe von Reduktionsmittel kann somit den ins Stocken geratenen Renaturierungsprozess wieder anstoßen und die Ausbeute verbessern.

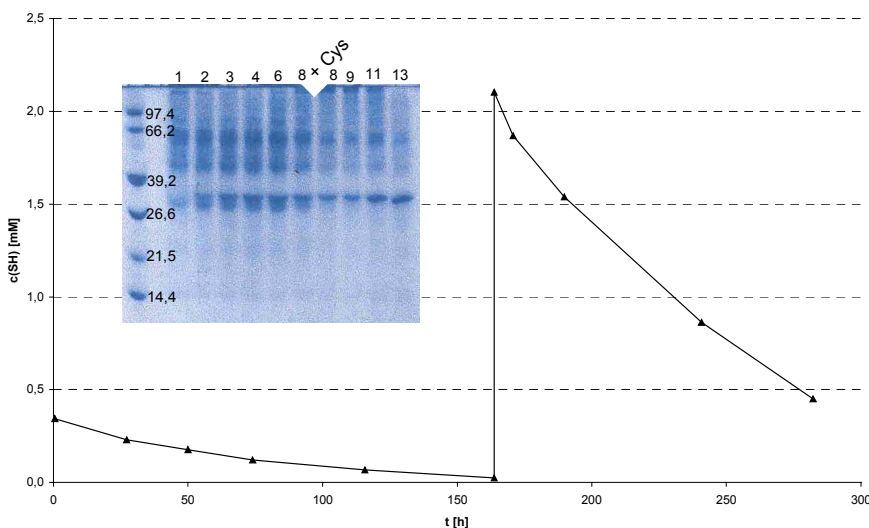


Abbildung IV-8: Zusammenhang von SH-Konzentration und Renaturierungseffizienz am Beispiel von Ansatz 4 (vgl. Tabelle IV-9 und Text).

IV.2.1.5.2.3 Optimierung der Proteinzugabe

Neben Pufferzusammensetzung und Cysteinkonzentration wurde auch untersucht, welchen Einfluss der zeitliche Abstand zwischen zwei Zugaben von Solubilisat, also zwischen den Pulsen, auf die Renaturierungseffizienz hat.

Bei 2 Argininkonzentrationen (0,6 und 1M) wurden jeweils 5 Aliquots von Solubilisat zugegeben, und zwar nach entweder jeweils 2 Stunden, 1 Tag oder 2 Tagen. Bei jedem Puls wurde zusammen mit dem Solubilisat auch eine Cysteinmenge entsprechend 0,5 mM zugegeben (Ansätze 24-26 und 27-29).

Je größer der zeitliche Abstand zwischen den Pulsen war, um so größer war auch die Ausbeute an löslichem Protein nach Ende des Experiments. Diese Beobachtung ist in Übereinstimmung mit der These, dass richtig gefaltetes Protein aus dem Gleichgewicht entfernt wird und nicht mehr an Aggregationsprozessen teilnimmt, denn die Gesamtmenge an zugegebenem Protein war in allen Ansätzen gleich. Je länger das Solubilisat Zeit hatte, richtig zu falten, um so mehr Protein blieb in Lösung. Allerdings blieben nicht nur Monomere in Lösung, sondern auch Aggregate.

Darüber hinaus wurde auch in diesem Experiment deutlich, dass eine höhere Argininkonzentration im Renaturierungspuffer die Gesamtausbeute an löslichem Protein und richtig gefaltetem rF7 erhöht.

IV.2.1.5.2.4 Temperatur

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde nochmals der Einfluss der Temperatur auf die Renaturierung untersucht. Ansätze 30 und 31 entsprechen den Ansätzen 2 und 4, wurden jedoch bei 4°C inkubiert. Bei dieser Temperatur war praktisch keine Renaturierung beobachtbar.

IV.2.1.6 Optimierte Renaturierungsbedingungen für rF7

Aus den Ergebnissen der verschiedenen Optimierungsexperimente wurden die in Tabelle IV-10 zusammengefassten endgültigen Renaturierungsbedingungen für rF7 abgeleitet.

Tabelle IV-10: optimierte Bedingungen für die Renaturierung von rF7

Solubilisierungspuffer	Entfernung des Redoxsystems	Renaturierungspuffer	Pulsrenaturierung
<ul style="list-style-type: none"> • 6 M GdmCl • 150 mM GSSG • 15 mM GSH • 20 mM EDTA • 100 mM Tris • pH 8,5 (RT) 	<ul style="list-style-type: none"> • 55% GdmCl • 20 mM EDTA • pH 5 (4°C) 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 M L-Arginin • 40% Ethylenglycol • 50 mM Tris • 20 mM CaCl₂ • 1 mM EDTA • pH 8,5 (15°C) 	<ul style="list-style-type: none"> • Zugabe von "0,5 mM" Cystein bei jedem Puls • mind. 1/2 Tag Abstand zwischen den Pulsen • Zugabe von 0,3 g IBs (Nassgewicht) pro Liter Renaturierungspuffer je Puls • Endkonzentration: 2,5 g IBs pro Liter Renaturierungspuffer, also etwa 0,3 g Protein/l • mindestens eine zusätzliche Cysteinzugabe einige Tage nach dem letztem Puls

IV.2.2 Aufreinigung von rF7

Die Aufreinigung von rF7 wurde im Kapitel III.2.3.6.1.2 ausführlich beschrieben und ist hier nur zusammengefasst.

Das Renaturat wurde zunächst aufkonzentriert. Bei der Konzentrierung war eine wichtige Beobachtung, dass rF7a trotz eines Molekulargewichts von 35,7 kDa nicht von einer 10K-Membran zurückgehalten wurde. Alle Konzentrierungsschritte für rF7(a) müssen daher über 5K oder 3K Membranen erfolgen. Das Konzentrat wurde gegen 20mM Tris, pH 8.5 (RT), 5mM CaCl₂, 5mM Benzamidin dialysiert.

Nach Abtrennung des Präzipitats durch Zentrifugation und Filtration erfolgte die Aufreinigung in zwei Schritten. Über einen Anionenaustauscher (Q-Sepharose-ff) wurden im ersten Schritt die Aggregate und fast alle *E. coli* Verunreinigungen entfernt. Der fast nur noch rF7 enthaltende Durchlauf der ersten Chromatographie wurde dann an einen Kationenaustauscher (Fractogel-EMD-SO₄²⁻) gebunden und rF7 im Salzgradienten eluiert. Die Ausbeute betrug etwa 3mg reiner rF7 je Liter *E. coli*-Kultur.

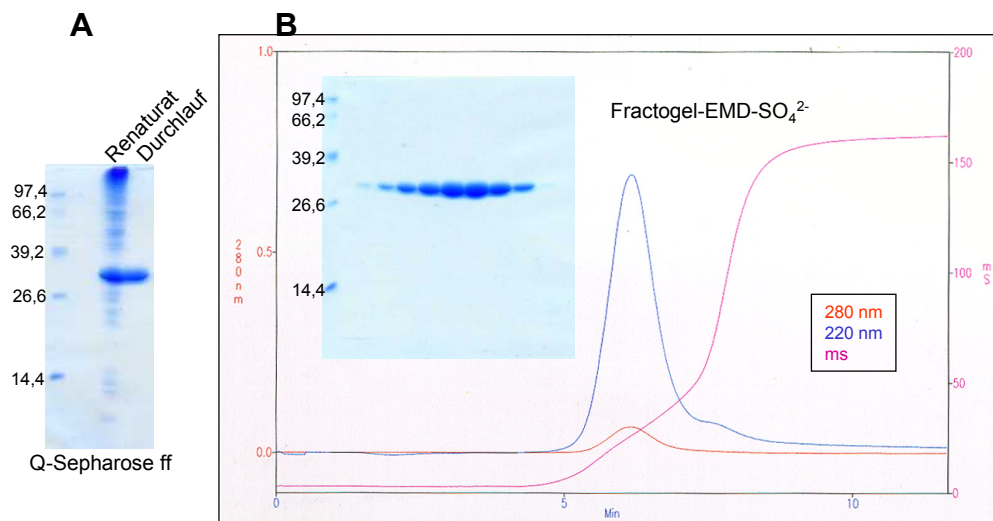


Abbildung IV-9: Aufreinigung von rF7. A, SDS-PAGE (nichtreduzierend) der Anionenaustauschchromatographie (40-fach konzentriert durch TCA-Fällung); B, Chromatogramm und SDS-PAGE (nichtreduzierend) der Kationenaustauschchromatographie. Aufgetragen sind jeweils 10µl Probe.

IV.2.3 Aktivierung von rF7

Die Aktivierung des sauberen rF7 erfolgte autokatalytisch, und zwar auch in der Gegenwart von 5mM Benzamidin, sobald das Zymogen nach dem zweiten Säulenschritt in einer Konzentration von 0,3-0,5mg/ml vorlag (vgl. S. 47).

Nach der Spaltung des Aktivierungspeptids erfolgte mit einiger Zeitverzögerung ein weiterer Schnitt in der Oberflächenschleife um Rest 170, zwischen Arg170C und Lys170D. Durch diese Spaltung wird die katalytische Domäne in zwei Fragmente von etwa 12 und 18 kDa gespalten. Ein weiterer proteolytischer Abbau des Enzyms über diese zwei Schnitte hinaus erfolgte nicht.

In Abbildung IV-10 ist das aktivierte Enzym im reduzierenden und nichtreduzierenden SDS-PAGE-Gel sowie ein Schema der Spaltstellen gezeigt. Im nichtreduzierenden Gel liegt rF7a als Einzelbande vor, da die Domänen über eine Disulfidbrücke kovalent verbunden bleiben,

während im reduzierenden Gel die Fragmente aufgetrennt sind. Neben der katalytischen Domäne und EGF2-AP sind auch Reste des Zymogens sowie die kürzeren Spaltprodukte der katalytischen Domäne zu erkennen.

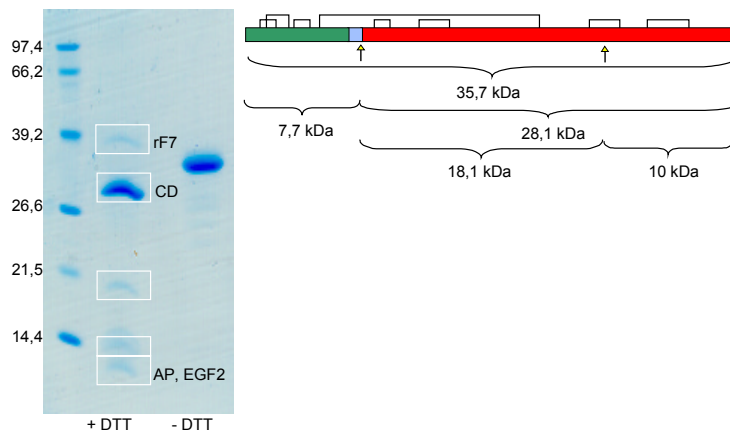


Abbildung IV-10: Aktivierung von rF7a: SDS-PAGE-Gel des gespaltenen Enzyms (links) und schematische Darstellung der Spaltstellen (rechts).

IV.2.4 Biochemische Charakterisierung von rF7a

Auf eine ausführliche enzymatische Charakterisierung von rF7a wurde verzichtet, da die Kristallstruktur (siehe ab IV.3.2) die korrekte Konformation des *in vitro* gefalteten Enzyms bestätigte.

Die Aktivität von rF7a war durch die Zugabe von löslichem TF (sTF) nicht stimulierbar. Dies ist in Übereinstimmung mit der Kristallstruktur des Komplexes beider Proteine (Banner et al., 1996). Die Kontaktfläche zwischen beiden Proteinen wird in erster Linie von der leichten Kette von FVIIa (1340 von insgesamt 1810 Å²), und hier hauptsächlich von der Gla- und EGF1- Domäne gebildet (1233 Å²). In rF7a ist also nur noch rund ein Drittel der ursprünglichen Kontaktfläche vorhanden, und dies reicht für die effiziente Bindung des Kofaktors nicht mehr aus.

Die Aktivität von rF7a war mit derjenigen von hFVIIa vergleichbar. Lösungen gleicher Molarität an Gesamtzym zeigen im Aktivitätsassay mit Chromozym t-Pa die gleiche Aktivität. Auf eine exakte Titration der aktiven Zentren des Enzyms wurde verzichtet. Die beschriebenen Titrationsmethoden für FVIIa beruhen alle auf der Bindung von Inhibitoren (ATIII/Heparin [Vijaya Mohan Rao et al., 1993] oder 4-NPGB [Neuenschwander et al., 1994]) in Gegenwart von TF. In Abwesenheit des Kofaktors werden diese Inhibitoren für eine Titration nicht fest genug an das aktive Zentrum von FVIIa gebunden. Molaritätsangaben in Zusammenhang mit der Aktivität des Enzyms beziehen sich stets auf die aus der Proteinkonzentration errechnete Molarität an Gesamtzym, unter der Annahme, dass das Enzym zu 100% aktiv ist.

IV.2.4.1 Ethylenglycol stimuliert die Aktivität von rF7a

Es ist bekannt, dass Ethylenglycol die Aktivität von FIXa und FVIIa stimuliert (Stürzebecher et al., 1997 und Neuenschwander et al., 1993, vgl. auch IV.1.4).

Für FVIIa ist eine 3,5-fache Stimulation der amidolytischen Aktivität in Gegenwart von 20% EG beschrieben, während dieser Alkohol auf den Komplex aus FVIIa und TF eine inhibitorische Wirkung hat. Ähnliches gilt für den Effekt von Glycerin: 30% bewirken eine 2,3-fache

Aktivitätssteigerung des freien Enzyms, während der Komplex inhibiert wird (Neuenschwander et al., 1993).

Es wurde untersucht, ob rF7a sich in Gegenwart dieser Alkohole ähnlich verhält wie das humane Enzym.

Ein Aliquot rF7 (0,28mg/ml) wurde zur Aktivierung 5 Tage bei 4°C gegen 20mM Tris (pH 8.5), 150mM NaCl, 5mM CaCl₂ dialysiert.

Die Untersuchungen wurden im Standardpuffer für Aktivitätstests (50mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, 0,1% PEG 8000, pH 8.0) unter Zusatz verschiedener Mengen der jeweiligen Alkohole durchgeführt. Als Substrat wurde 0,5mM Chromozym t-Pa verwendet, die eingesetzte Enzymmenge betrug 4,2µg/ml, entsprechend einer Konzentration von 118nM rF7a.

Der Übersichtlichkeit halber wurden die gemessenen Aktivitäten auf die Ausgangsaktivität ohne Zusatz von Alkohol normiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV-11 und Abbildung IV-11 dargestellt.

Tabelle IV-11: Aktivitätsänderung von rF7a in Gegenwart verschiedener Alkohole und Aktivitätsänderung von hFVIIa in Gegenwart von Ethylenglycol, normiert auf die Ausgangsaktivität ohne Zusatz von Alkohol.

% Zusatz	Ethylenglycol v/v ₀	Glycerin v/v ₀	Methanol v/v ₀	Ethanol v/v ₀	2-Propanol v/v ₀	hFVIIa Ethylenglycol v/v ₀
0	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
5	2,92	1,85	1,03	0,64	0,48	
10	4,38	2,50	0,97	0,43	0,29	3,20
15	4,81	2,82	0,82	0,24	0,11	4,02
20	4,84	3,00	0,59	0,15	0,05	4,89
25	4,42	2,88	0,40	0,08	0,02	
30	3,69	2,83	0,22	0,03	0,00	2,17
35	2,76	2,41	0,14	0,01	0,00	
40	1,90	1,74	0,08	0,00	0,00	
45	1,30	1,13	0,05	0,00	0,00	
50	0,94	0,63	0,02	0,00	0,00	

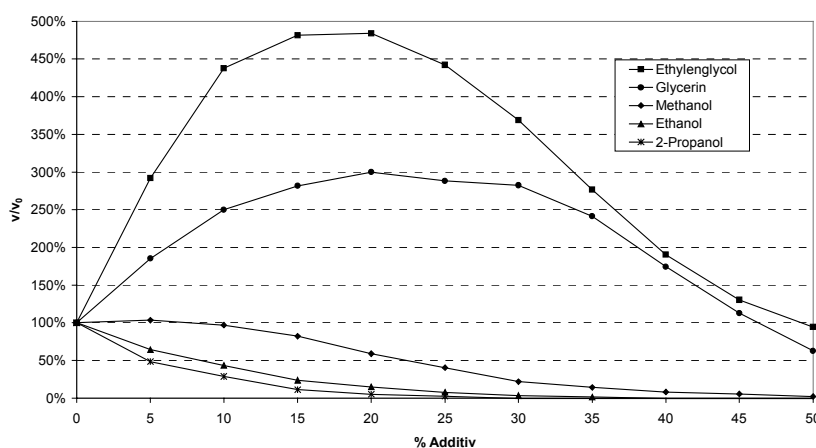


Abbildung IV-11: Aktivitätsänderung von rF7a in Gegenwart verschiedener Alkohole.

Die größte Aktivitätssteigerung, nämlich auf fast den fünffachen Wert der Ausgangsaktivität, wurde mit 20% Ethylenglycol erzielt. Auch Glycerin hatte einen positiven Effekt, hier konnte die Aktivität durch Zugabe von 20% Glycerin verdreifacht werden.

Methanol wirkte ab einer Konzentration von 10% inhibitorisch, Ethanol und 2-Propanol bereits von Beginn an. Ab 40% Ethanol bzw. 30% 2-Propanol war keine Aktivität mehr messbar.

Die maximalen Aktivitätssteigerungen waren bei etwas niedrigeren Alkoholkonzentrationen erreicht und fielen höher aus, als bei Neuenschwander et al. (1993) für hFVIIa gezeigt worden war. Dies ist vermutlich auf die leicht unterschiedlichen Reaktionsbedingungen zurückzuführen, denn unter den hier verwendeten Bedingungen konnte für hFVIIa mit 20% EG eine maximale Aktivitätssteigerung von 489% gemessen werden, entsprechend derjenigen von rF7a.

IV.2.5 Vergleich der Renaturierung von rF7 und rF9

Die Tatsache, dass rF7 nur in Gegenwart von Ethylenglycol renaturierbar war, und außerdem die Aktivität des Enzyms durch diesen Alkohol stimuliert wurde, warf die Frage auf, ob die Renaturierung in Gegenwart von EG auf der spezifischen Stabilisierung eines mobilen Bereiches der katalytischen Domäne beruhte. Ist dies der Fall, so sollte auch Glycerin einen positiven Einfluss auf die Renaturierung haben. Darüberhinaus wäre denkbar, dass auch ein Inhibitor wie Benzamidin ein partiell gefaltetes Zwischenprodukt durch Stabilisierung des aktiven Zentrums stabilisieren und somit die Renaturierung begünstigen könnte.

Wäre der Einfluss von EG auf die Renaturierung ein spezifischer Effekt, so wäre weiterhin möglich, dass auch die Renaturierung von rF9 in Gegenwart von EG verbessert abläuft, da auch die Aktivität von rF9a durch Zugabe von EG gesteigert werden kann.

Um diese Frage zu untersuchen, wurde eine Serie von Renaturierungsexperimenten mit rF7 und rF9 durchgeführt.

Die IBs wurden mit einer Konzentration von 100mg/ml in Standard-Solubilisierungspuffer gelöst und dialysiert. In jeden Ansatz wurden im Abstand von 2 Tagen 2 Pulse à 0,5mg/ml gegeben, die Zugabe von 0,5mM Cystein erfolgte jeweils kurz vor den Pulsen und ein drittes Mal 2 Tage nach dem zweiten Puls. Die Ansätze wurden bei 15°C inkubiert und nach insgesamt 3 Wochen gegen 20mM Tris (pH 8.5), 5mM CaCl₂ dialysiert. Die Überstände wurden mit TCA-Fällung aufkonzentriert und Aliquots entsprechend 400µl Renaturat auf nichtreduzierenden SDS-PAGE-Gelen aufgetrennt. Die Ergebnisse dieses Experiments und die detaillierten Renaturierungsbedingungen sind in Abbildung IV-12 dargestellt.

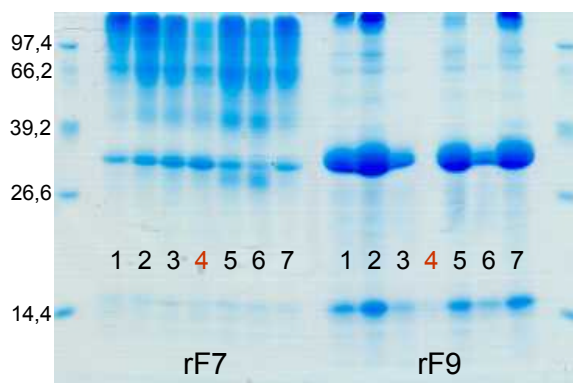


Abbildung IV-12: Renaturierung von rF7 und rF9 in Gegenwart von EG, Glycerin und Benzamidin. Die Renaturierungspuffer beinhalteten in allen Fällen 50mM Tris (pH 8.5), 20mM CaCl₂, 1mM EDTA, sowie folgende Zusätze: 1: 0,5M Arginin; 2: 1M Arginin; 3: 1M Arginin, 20% EG; 4: 1M Arginin, 40% EG; 5: 1M Arginin, 20% Glycerin; 6: 1M Arginin, 40% Glycerin; 7: 1M Arginin, 10mM Benzamidin.

Zunächst wird deutlich, dass die Renaturierungseffizienz von rF7 auch unter den optimierten Bedingungen weit hinter der von rF9 zurückbleibt.

Bei rF7 ist in Anwesenheit von 40% EG die Ausbeute an Monomer am besten und der Aggregatanteil am niedrigsten. Zusatz von Glycerin statt EG verringert die Ausbeute, und der Aggregatanteil steigt an. Die Gegenwart von 10 mM Benzamidin hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Renaturierungseffizienz.

Bei rF9 kann die Ausbeute durch Erhöhung der Argininkonzentration deutlich gesteigert werden (Spuren 1 und 2). Bei 20% EG sind fast keine Aggregate mehr im Renaturat, allerdings ist auch die Ausbeute an Monomer stark reduziert. In Gegenwart von 40% EG blieb quasi kein Protein mehr in Lösung. Ähnlich, wenn auch nicht ganz so ausgeprägt, ist die Situation bei der Zugabe von Glycerin: Bei 20% ist in erster Linie der Aggregatanteil reduziert, bei 40% geht die Gesamtausbeute stark zurück. Benzamidin hatte auch hier keinen Einfluss auf die Renaturierungseffizienz.

Der Effekt von EG auf die Renaturierung von rF7 und rF9 ist insofern ähnlich, als bei beiden Proteinen der Aggregatanteil in der löslichen Fraktion zurückgeht. In rF7 geht dies mit einer leichten Verbesserung der Monomerausbeute einher, in rF9 hingegen mit einer Verschlechterung.

Glycerin hält in rF7 offenbar mehr Protein in Lösung als Arginin alleine oder in Kombination mit EG. Die Renaturierung ist jedoch verschlechtert. In rF9 ist in Gegenwart von Glycerin die Löslichkeit schlechter als im Puffer ohne Glycerin, jedoch besser als in der Gegenwart von EG. Die Ausbeute geht auch hier zurück.

Das unterschiedliche Verhalten beider Enzyme mit den verschiedenen Puffern betont erneut die Sonderstellung von rF7 bezüglich seiner Renaturierung. Trotz der großen Homologie von rF9 und rF7 haben die verglichenen Pufferbedingungen eine sehr unterschiedliche Wirkung auf Löslichkeit und Renaturierungsverhalten des Proteins.

Der negative Einfluss von Glycerin auf die Renaturierung von rF7 spricht dagegen, dass die Renaturierung von rF7 in Gegenwart von EG auf einer spezifischen Stabilisierung eines Übergangszustandes beruht, da eine solche Stabilisierung vermutlich auch durch Glycerin vermittelt werden könnte. Auch für rF9 wäre ein positiver Effekt zu erwarten, zumal hier die EG-vermittelte Aktivitätssteigerung etwa doppelt so hoch ist wie für rF7 (siehe IV.1.4), die Bindung von EG also vermutlich noch stärker ist.

Andererseits kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der Renaturierungsprozess bei beiden Enzymen über unterschiedliche Zwischenformen abläuft. Die bei rF7 auftretenden Intermediate könnten dann andere Anforderungen an den Puffer stellen als diejenigen von rF9, um in Lösung zu bleiben. Es ist auch möglich, dass unterschiedliche Bereiche der katalytischen Domäne zu verschiedenen Zeitpunkten falten, und in einem frühen Stadium die spezifische Bindung von EG für rF7 förderlich ist, während sie in rF9 nicht nötig ist, da vielleicht andere Bereiche zuerst falten und dem Protein eine stabilere Konformation geben.

Die produktiven Intermediate im Renaturierungsprozess beider Proteine sind nicht bekannt und wurden auch nicht weiter untersucht, da solche Intermediate meist nur sehr kurzlebig und experimentell schwer zugänglich sind (Creighton et al., 1996). Da der genaue Faltungsweg der Enzyme nicht bekannt ist, konnte die Frage nicht geklärt werden, warum rF7 sich in der Renaturierung anders verhält als die verwandten Enzyme rF9, rF10, Trypsin und rXY, und ob der positive Effekt von EG auf einer spezifischen Bindung an rF7 während der Renaturierung beruht.

IV.3 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse von rF7a

IV.3.1 Kristallisation von rF7a

Für die Kristallisation von rF7a wurden Aliquots des bei -80°C gelagerten Pools (20mM Tris (pH8.5), 5mM CaCl_2 , 300mM NaCl, 5mM BA) des zweiten Säulenschritts aufgetaut und über 3K oder 5K Membranen auf 7mg/ml aufkonzentriert. Die Kristallisationsbedingungen wurden freundlicherweise von A. D'Arcy und D. Banner (Hoffmann La Roche AG, Basel) zur Verfügung gestellt und waren wie folgt:

0,1M Bicine (pH 8.5), 2M $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4^{2-}$, 15% Glycerin, 2% PEG 400.

Die Kristallisation wurde im Dampfdiffusionsverfahren nach der *sitting drop* Methode durchgeführt (2 μl Protein + 4 μl Reservoir). Die Kristalle wuchsen innerhalb von 2 Wochen bis zu einer Größe von 0,2mm und streuten bis 1,69Å (Synchrotronstrahlung, vgl. Abbildung IV-13).

Es wurden 2 Kristallstrukturen von rF7a gelöst: Die Struktur von rF7a in Komplex mit Benzamidin bis zu einer Auflösung von 1,69Å, sowie die Struktur von rF7a ohne Benzamidin mit einer Auflösung von 2,44Å.

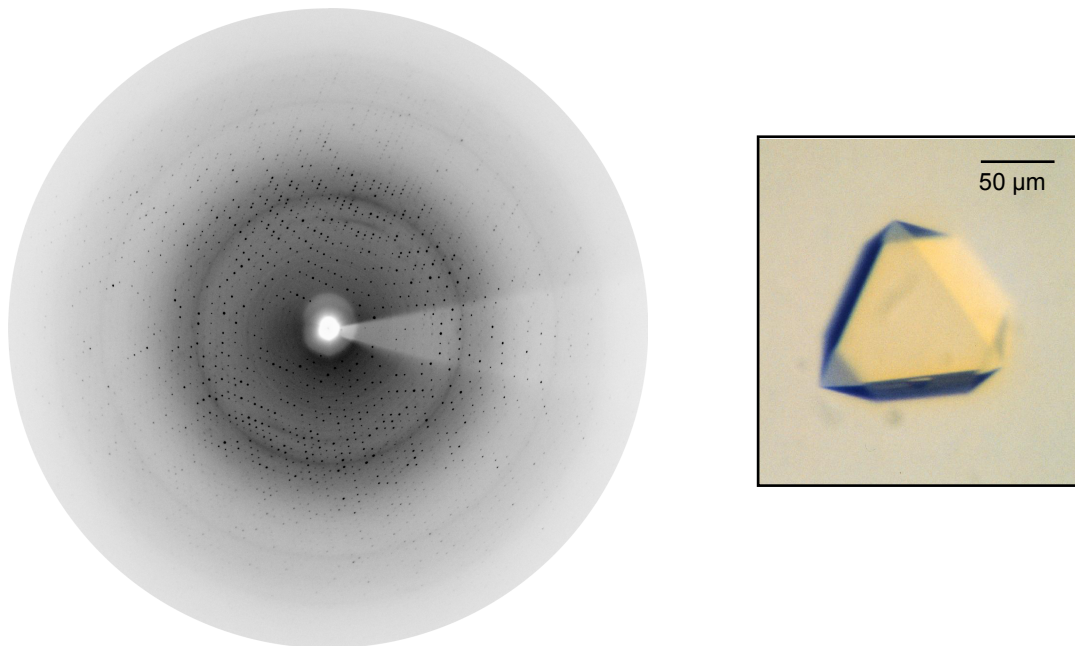


Abbildung IV-13: Kristalle von rF7a und Beugungsbild einer $0,5^{\circ}$ Rotationsaufnahme von rF7a im Komplex mit Benzamidin. Der Plattenrand entspricht einer Auflösung von 1,69Å.

IV.3.2 Röntgenstrukturanalyse des Komplexes von rF7a mit Benzamidin

IV.3.2.1 Datensammlung

Die rF7a-Kristalle wurden zur Messung direkt in einen Cryoloop geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Datensammlung erfolgte bei 100K mit Synchrotron-Strahlung ($\lambda = 0,873 \text{ \AA}$) auf einem Mar 345 Image-Plate Detektor (Marresearch, Hamburg) an der Swiss-Norwegian Beamline SNBL-BM1A, ESRF, Grenoble. Die Belichtungszeit betrug 1min, der Drehwinkel je Aufnahme $0,5^\circ$. Es wurde ein Bereich von 50° gemessen. Die Kristalle streuten bis zu einer maximalen Auflösung von 1.69 \AA .

Die Raumgruppe und Zellparameter wurden mit dem Programm DENZO (Otwinowski, 1993) bestimmt.

Die gesammelten Daten wurden anschließend mit dem Programm MOSFLM (Version 5.23, Leslie, 1994) integriert und mit den Programmen SORTMTZ, SCALA, TRUNCATE und MTZ2VARIOUS aus der CCP4-Programmsuite (Version 4.0) skaliert und reduziert.

Die Datenprozessierungsstatistik ist in Tabelle IV-12 zusammengefasst.

Tabelle IV-12: Datenprozessierungsstatistik für rF7a^{BA}

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2
Zellkonstanten (\AA , $^\circ$)	
a	95,35
b	95,35
c	116,55
α	90
β	90
γ	90
Einheitszellenvolumen (\AA^3)	1059629
V_m ($\text{\AA}^3/\text{Da}$) (entspricht $\% \text{H}_2\text{O}$)	3,7 (67%)
Anzahl der Komplexe pro asymmetrischer Einheit	1
Begrenzende Auflösung	1,69
Gemessene Reflexe	556747
Unabhängige Reflexe	59659
Vollständigkeit der Daten	98,30%
letzte Schale	87,60%
Multiplizität	9,33
R_{merge}	5,70%
letzte Schale	65,20%

IV.3.2.2 Modellbau und Verfeinerung

Raumgruppe und Zellkonstanten des rF7a-Kristalls entsprachen denjenigen des PDB-Eintrags 1cvw (Kemball-Cook et al., 1999) für des-Gla-FVIIa. Die Lage des Proteinmoleküls in der asymmetrischen Einheit wurde daher über *rigid body* Minimierung in X-PLOR unter Zuhilfenahme der Koordinaten 1cvw mit den Daten von 8 bis $2,5 \text{ \AA}$ bestimmt. Für diese *rigid body* Minimierung wurden die beiden Domänen als zwei separate strukturelle Einheiten betrachtet. Der R-Faktor lag nach dieser ersten Minimierung bei 35,6%.

Nach einer ersten Positionsverfeinerung für alle Atome wurden am N-Terminus der EGF2-Domäne 6 Reste eingebaut, die in 1cvw nicht vorhanden waren. Der Inhibitor Benzamidin wurde in SYBYL erstellt und ebenfalls in die Dichte eingefügt.

Es folgten mehrere Zyklen von manuellem Modellbau und automatischer Verfeinerung mit den Programmen MAIN und CNS, in deren Verlauf vier SO_4^{2-} -Ionen, ein Ca^{2+} -Ion und ein Glycerinmolekül in die Dichte eingebaut und insgesamt 299 Solvensmoleküle automatisch positioniert wurden. Für einige Reste wurden darüber hinaus alternative Seitenkettenkonformationen eingebaut (EGF2: T128, CD: V35, I50, L64, S82, Q239). Nach Verfeinerung der individuellen B-Faktoren und Erhöhung des Gewichts des kristallographischen Terms betrug der R-Faktor 20,9% und R_{free} 22,5%. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit den Programmen PROCHECK und WHATCHECK überprüft, die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells ist in Tabelle IV-13 zusammengefasst. In Abbildung IV-14 ist eine Übersicht über die Struktur von rF7a^{BA} und die Lage der gebundenen Liganden Benzamidin, Sulfat, Ca^{2+} und Glycerin gegeben.

Tabelle IV-13: Verfeinerungsstatistik für rF7a^{BA}

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich	50,0 - 1,69 Å
verwendete Reflexe	59659
Reflexe im Arbeitsset	53613
Reflexe im Testset	6046
R-Faktor (%)	20,9
R_{free} (%)	22,45
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen (Å)	0,006
Bindungswinkel (°)	1,26
r.m.s. B (Å ²)	5,21
Mittlerer B-Faktor	26,58
Hauptkettenatome (Å ²)	24,2
Seitenkettenatome (Å ²)	28,5
Wassermoleküle (Å ²)	31,1
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	
Nichtwasserstoffproteinatome	2442
Nichtwasserstoffinhibitoratome	9
Solvensmoleküle	299
Liganden	27
(Φ, Ψ) - Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich	86,70%
zusätzliche erlaubten Bereich	12,20%
weitläufig erlaubten Bereich	0,80%
verbotenen Bereich	0,40%

IV.3.2.3 Strukturbeschreibung

IV.3.2.3.1 Überblick

Die Struktur von rF7a mit Benzamidin (im Folgenden rF7a^{BA}) weist eine große Ähnlichkeit mit den bereits publizierten Strukturen von kovalent inhibiertem Faktor VIIa auf (PDB-Einträge 1dan (Banner et al., 1996), 1cvw (Kemball-Cook et al., 1999), 1qfk (Pike et al., 1999)). Insbesondere im Vergleich mit der Modellstruktur 1cvw, die aus der gleichen Kristallform bestimmt wurde, sind kaum Unterschiede feststellbar. Eine Überlagerung der erwähnten Strukturen mit derjenigen von rF7a^{BA} ist in Abbildung IV-15 gezeigt.



Abbildung IV-14: Überblick über die Struktur von rF7a und die Lage der gebundenen Liganden. Die katalytische Domäne ist grün, die EGF2-Domäne grau dargestellt.



Abbildung IV-15: Überlagerung der Kristallstrukturen der EGF2- und katalytischen Domäne von rF7a^{BA} (rot), 1cvw (grün), 1qfk (gelb) und 1dan (blau). Gezeigt ist der Verlauf der Hauptkette, sowie im Detail die Seitenketten der Reste der katalytischen Triade und die Liganden Benzamidin, vier Sulfate, Ca²⁺ und Glycerin.

IV.3.2.3.2 Konformation des aktiven Zentrums und Bindung des Inhibitors Benzamidin in rF7a^{BA}

Die Reste der katalytischen Triade, die Substratbindungsregion und die Aktivierungsdomäne (Reste 16-18, 142-152, 186-194, 216-223) sind in allen publizierten FVIIa-Strukturen und in rF7a^{BA} hoch konserviert und gut überlagerbar. Abweichungen zwischen rF7a^{BA} und den anderen Strukturen sind in erster Linie dort zu beobachten, wo durch die Interaktion mit großen peptidischen Inhibitoren in den jeweiligen Komplexstrukturen die Konformation einzelner Oberflächenschleifen (60-61 in 1fak; 142-153 in 1dva) beeinflusst wurde. In den Strukturen mit kleinen, kovalenten Inhibitoren (1cvw, 1qfk, 1dan) verlaufen diese Schleifen jedoch gleich wie in rF7a^{BA}.

Die S1-Tasche von rF7a^{BA} hat die gleiche Konformation wie diejenige der anderen FVIIa-Strukturen und entspricht der konservierten S1-Tasche von trypsinartigen Serinproteasen. Das N-terminale Ile 16 ist korrekt insertiert und bildet eine Salzbrücke zur Seitenkette des Asp 194 aus, wodurch die katalytischen Reste korrekt positioniert werden.

Die Bindung des Benzamidin in die S1-Tasche entspricht dem bekannten Bindemodus für Benzamidin in Serinproteasen. Die Amidinogruppe wird über Twin-twin-Salzbrückenbildung zur Carboxylgruppe des Asp189 stabilisiert. Die Oxyaniontasche wird von einem Sulfation (401) besetzt, entsprechend der Situation in einer Reihe von Trypsinstrukturen mit Benzamidin. In Abbildung IV-16 ist eine Detailansicht der S1-Tasche mit dem gebundenen Inhibitor und der 2Fo-Fc-Elektronendichte gezeigt.

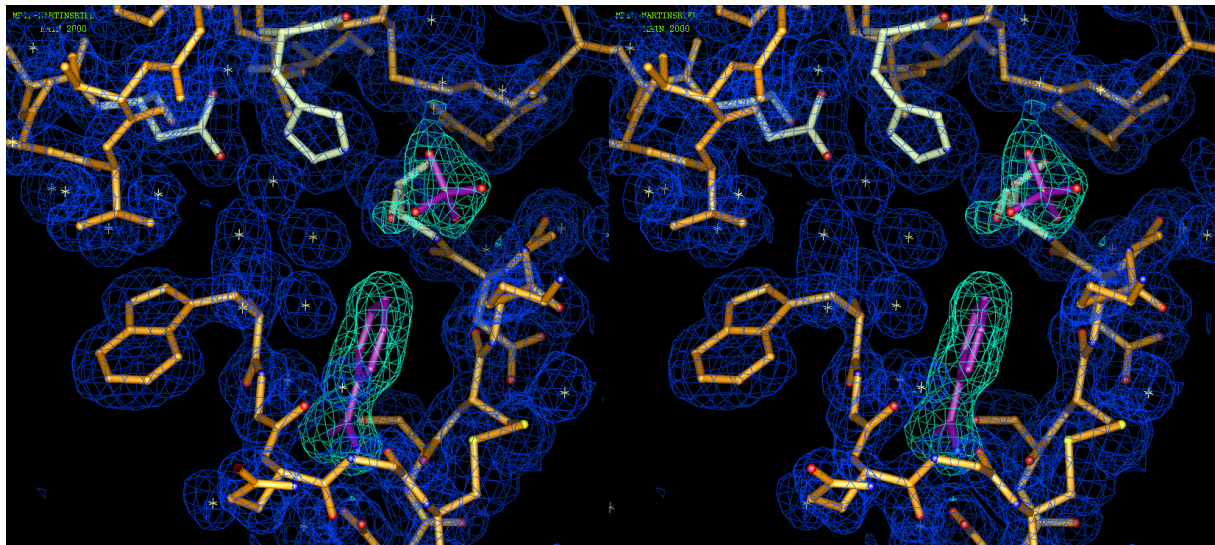


Abbildung IV-16: Stereodarstellung der S1-Tasche von rF7a^{BA} mit der finalen 2Fo-Fc-Elektronendichte (1 σ -konturiert). Gezeigt sind die Reste 189-195, 215-220, 54-59 und 94-102 (orange). Die Reste der katalytischen Triade sind weiß hervorgehoben. In lila dargestellt sind außerdem das Benzamidin und das in der Oxyaniontasche gebundene Sulfatmolekül. Gebundene Wassermoleküle sind als weiße Sterne eingezeichnet

IV.3.2.3.3 170-Loop und intermediäre Helix

Die Oberflächenschleife zwischen den Cysteinresten 168 und 182 ist in Faktor VIIa um 5 Reste (Arg170C - Asp170G) länger als bei den anderen Mitgliedern der Faktor IX-Genfamilie (vgl. Sequenzvergleich, Abbildung II-4). Diese Insertionsschleife ist in den bekannten Strukturen teilweise ungeordnet oder flexibel. Auch in rF7a^{BA} haben diese 5 Reste einen erhöhten B-Faktor, was auf eine gesteigerte Flexibilität hindeutet. In der Kristallpackung von rF7a^{BA} befindet sich neben dem 170-Loop eine große Lücke. Die Beweglichkeit dieser Oberflächenschleife wird somit im Kristall nicht eingeschränkt. Trotzdem ist bei niedriger Konturierung der Elektronendichte der Verlauf der Schleife gut zu erkennen (Abbildung IV-17).

N-terminale Sequenzierung von rF7a aus aufgelösten Kristallen ergab, dass diese Insertionsschleife zwischen den Resten Arg170C und Lys170D zu etwa 30% gespalten ist. Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Berichten, dass an dieser Position in Faktor VIIa eine spezifische autolytische Spaltung erfolgen kann (Kemball-Cook et al., 1999). Kembell-Cook et al. (1999) hatten berichtet, dass die Spaltung zwischen Arg170C und Lys170D für die Kristallisation von des-Gla-FVIIa notwendig war. Im vorliegenden Fall findet die Spaltung im Kristallisationspuffer ebenfalls statt. Sie ist aber offenbar keine Voraussetzung für die

Kristallisation, denn das Protein ist im Kristall nicht vollständig gespalten und es ist eine durchgängige Hauptkette in der Elektronendichte zu sehen.

In Abbildung IV-17 ist der 170-Loop mit einer niedrig konturierten Elektronendichte gezeigt. Dargestellt sind außerdem zwei Sulfationen, die in der Nachbarschaft des Loops in der Elektronendichte positioniert werden konnten.

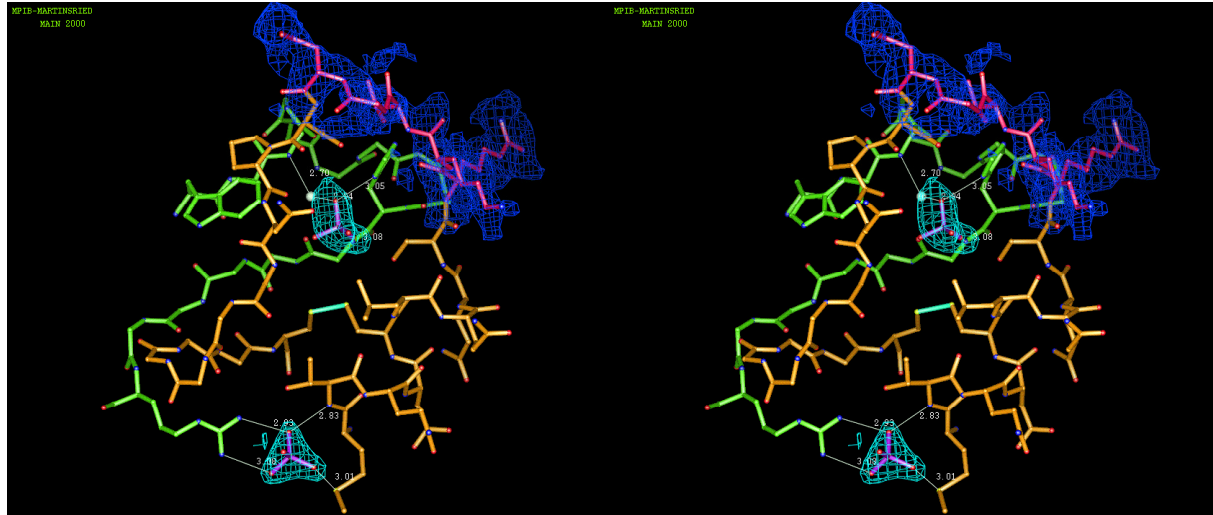


Abbildung IV-17: Stereodarstellung des 170-Loops. Die Reste 164-170B und 170H-182 sind orange, die Reste 170C-170G pink, die Reste 215-230 grün, die beiden Sulfate lila und das Wasser 501 als weiße Kugel dargestellt. Die Reste 164, 168, 170A-175, 182, 215 und 230 sind inklusive ihrer Seitenketten dargestellt, die übrigen Resten nur mit ihren Hauptkettenatomen. Für die FVIIa-spezifische Insertion 170C-170G ist eine $0,3\sigma$ -konturierte 2Fo-Fc-Elektronendichte, für die Sulfate eine 1σ -konturierte 2Fo-Fc-Elektronendichte gezeigt. Außerdem sind die Abstände zwischen den Sulfaten und den mit ihnen interagierenden Proteinatomen eingezeichnet.

Eines der Sulfationen (402) ist am „Boden“ des 170-Loop gebunden. Es wird über Wasserstoffbrücken zu N δ von His224 und zum Hauptketten-Stickstoff von Phe225 stabilisiert (Abstände 3,05 bzw. 3,08Å), sowie indirekt über das Wassermolekül 501 durch den Hauptketten-Stickstoff von Gln217 (Abstände 2,94 und 2,70Å). Die Elektronendichte für dieses Sulfat ist nicht ganz so deutlich wie für die anderen drei Sulfate. Es war jedoch deutlich, dass an dieser Stelle ein größeres Solvensmolekül gebunden hatte. Aufgrund der Zusammensetzung des Kristallisationspuffers (2M AS) und der Form der Elektronendichte wurde angenommen, dass es sich bei diesem Molekül um ein Sulfation handelte. An dieser Position zwischen dem 170-Loop und dem Rand der S1-Tasche war in anderen FVIIa-Strukturen bereits ein Cacodylat-Ion aus dem dortigen Kristallisationspuffer lokalisiert worden (1dan und 1dva).

Ein weiteres Sulfat (403) bindet in eine basische Tasche, die sich N-terminal der sogenannten intermediären Helix 165-170 befindet. Es wird über Wasserstoffbrücken zu NH1 und NH2 der Guanidiniumgruppe des Arg230 (3,08 bzw. 2,93Å) stabilisiert, außerdem über Interaktion mit N Thr165 (2,83Å) und S δ Met164 (3,01Å).

α -Helices in Proteinen besitzen ein Dipolmoment, da die Carbonylsauerstoffe alle in eine, die Amidstickstoffe alle in die andere Richtung zeigen. Die Helices werden in Proteinen oftmals durch die Positionierung negativ geladener Gruppen an ihrem positiven Ende stabilisiert. Vor der intermediären Helix von FVIIa fehlt ein entsprechender geladener Rest, es befindet sich hier das Met164. Die betrachtete Region bildet Teil einer Interaktionsfläche mit dem N-terminalen Teil der großen Domäne des Kofaktors. Im Komplex bindet die Carboxylgruppe der Seitenkette von Glu91, dem N-terminalen Rest dieser TF-Domäne, an den Eingang der Helix und stabilisiert diese damit. An die Helix 165-170 schließt sich direkt der 170-Loop an, und

die korrekte Konformation der Helix stabilisiert auch die Konformation des Loops, welcher seinerseits in engem Kontakt mit der Aktivierungsdomäne 216-223 steht.

In der vorliegenden Struktur wird die Position des Glu91 von Sulfat 403 eingenommen und damit die stabilisierende Wirkung des Kofaktors auf diesen Bereich nachgeahmt.

IV.3.2.3.4 Weitere Liganden in rF7a^{BA}

IV.3.2.3.4.1 Sulfate

Neben den drei bereits erwähnten Sulfationen konnte im C-terminalen Bereich der katalytischen Domäne ein weiteres Sulfat (404) in die Elektronendichte eingefügt werden.

Der C-Terminus von FVIIa ist um 11 Reste länger als die Termini von FIXa und FXa. Im Anschluss an die C-terminale Helix machen diese Reste in FVIIa einen Bogen rückwärts und verlaufen zurück in Richtung der 90- und 60-Loops. In diesem Bogen sitzt das vierte Sulfat. Es bildet direkt eine Wasserstoffbrücke mit dem Hauptkettenstickstoff von Glu245 (2,89Å) aus, sowie über die Wasser 686 und 675 mit den Carbonylsauerstoffen von Arg243 und Glu245.

IV.3.2.3.4.2 Glycerin

Von besonderem Interesse ist ein Glycerinmolekül (GOL), welches in einer hydrophoben Tasche in der Nähe des aktiven Zentrums, nämlich zwischen den Oberflächenschleifen um Rest 60 und um Rest 90, lokalisiert wurde. Das Glycerin wird durch eine Reihe von Wasserstoffbrücken stabilisiert: O2 bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Carbonylsauerstoff von Phe59 (2,57Å), und O1 wird über H₂O 562 (2,56Å) an Oδ1 Asp60 (2,77Å) und O Ala56 (2,88Å) gebunden (Abbildung IV-18).

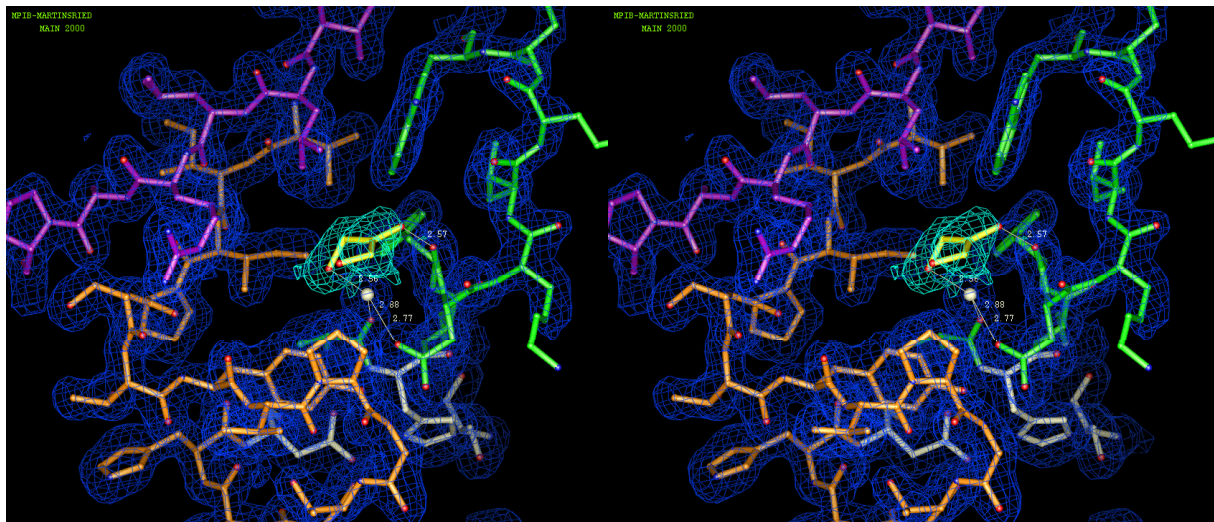


Abbildung IV-18: Bindung von Glycerin (gelb) an rF7a^{BA}. Gezeigt sind die Reste 56-61 (grün), 88-102 (orange), 249-255 (lila) und H₂O 562 (weiße Kugel). Die Reste der katalytischen Triade (57, 102, 195) sind weiß hervorgehoben. Die finale 2Fo-Fc-Elektronendichte ist 1 σ -konturiert eingezeichnet.

IV.3.2.3.5 Konformation der EGF2-Domäne

Die EGF2-Domäne von rF7a^{BA} ist etwas weniger gut geordnet als die katalytische Domäne, der durchschnittliche B-Faktor für diese Domäne beträgt 35\AA^2 , im Gegensatz zu 24\AA^2 für die katalytische Domäne.

Die Konformation der EGF2-Domäne ist unter den bekannten FVIIa-Strukturen konserviert. Ihre Anordnung relativ zur katalytischen Domäne hingegen variiert: in Abwesenheit des Kofaktors TF ist die EGF2-Domäne um $7,5^\circ$ um die Disulfidbrücke, welche leichte und schwere Kette verbindet, gedreht (Kemball-Cook et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass die Domänen von FVIIa durch die Bindung des Kofaktors in eine gestreckte Konformation gebracht werden und so das aktive Zentrum im optimalen Abstand zur Zellmembran positioniert wird, um die makromolekularen Substrate effizient umsetzen zu können.

In rF7a^{BA} verläuft die EGF2-Domäne weitgehend identisch wie diejenige des Modells 1cvw (RMS der C_α $0,36\text{\AA}$). Zusätzlich zum Modell wurden N-terminal 6 weitere Reste positioniert. Diese sind zwar recht flexibel (hohe B-Faktoren), geben jedoch einen Anhaltspunkt darüber, wie das Verbindungsstück zur (hier nicht vorhandenen) EGF1-Domäne in dieser Kristallform verläuft.

IV.3.3 Röntgenstrukturanalyse von freiem rF7a

IV.3.3.1 Vorbereitung des Kristalls

In diesem Experiment sollten drei Dinge gleichzeitig untersucht werden:

1. Der Inhibitor Benzamidin wurde aus dem aktiven Zentrum entfernt. Es sollte untersucht werden, ob die aktive Konformation des aktiven Zentrums, wie sie in allen bekannten Strukturen von Faktor VII bisher beschrieben wurde, auch in Abwesenheit des Inhibitors erhalten bleibt. Insbesondere war von Interesse, ob das N-terminale Ile16 inseriert bleibt und weiterhin über eine Salzbrücke zu Asp194 die Konformation der katalytischen Triade stabilisiert.
2. Das Glycerin im Kristallisationspuffer wurde durch Ethylenglycol ersetzt. Es sollte untersucht werden, ob das in der Struktur gebundene Glycerinmolekül durch ein Ethylenglycolmolekül ersetzt wird.
3. Es wurde versucht, Zink an das Protein zu binden. Zink inhibiert die Aktivität von Faktor VIIa. Es bindet vermutlich zusätzlich zum Ca^{2+} in der Ca^{2+} -Bindeschleife des Enzyms und modifiziert dessen Konformation (Petersen et al., 2000). Diese These sollte kristallographisch überprüft werden.

Der Kristall wurde in mehreren Schritten vorbereitet: Zunächst wurde das Benzamidin entfernt und das Glycerin durch Ethylenglycol ersetzt. Dazu wurde der Kristall in 0,5ml des folgenden Puffers umgelegt:

0,1M Bicine (pH 8,5), 2M $(\text{NH}_4^+)_2\text{SO}_4^{2-}$, 15% Ethylenglycol, 2% PEG 400, 2mM CaCl_2 .

Der Puffer wurde insgesamt 6 mal im Abstand von 2 Stunden erneuert, um sicherzugehen, dass das Benzamidin und Glycerin vollständig ausgewaschen wurden. Im Anschluss daran folgte eine kürzere Inkubation in einem zinkhaltigen Puffer. Da das Löslichkeitsprodukt von ZnSO_4 nur 0,3M beträgt, im Kristallisationspuffer jedoch 2M SO_4^{2-} vorhanden sind, wurde das Ammonsulfat gegen ein anderes Präzipitans, nämlich 25% PEG 6000 ersetzt:

0,1M Bicine (pH 8,5), 25% PEG 6000, 15% Ethylenglycol, 2% PEG 400, 10mM ZnCl_2 , 10mM CaCl_2 .

Dieser Puffer war 15 Stunden vor Benutzung vorbereitet worden. Nachdem der Kristall in 0,5ml des Puffers umgelegt worden war, fiel auf, dass einige Pufferbestandteile, mit hoher Wahrscheinlichkeit unter anderem die Zink-Ionen, auskristallisiert waren. Daher wurde nach einer halben Stunde Inkubation 15 μl 1M ZnCl_2 neben den Kristall pipettiert, sodass die lokale Konzentration an Zn^{2+} sehr viel höher als 10mM war. Nach einer weiteren Stunde wurde der Kristall in einen Cryo-Loop geerntet und im *Cryostream* schockgefroren.

IV.3.3.2 Datensammlung

Die Datensammlung erfolgte bei 100K auf einem Mar 345 Image-Plate Detektor (Marresearch, Hamburg), montiert auf einem Rigaku300 Generator. Die Belichtungszeit betrug 20min, der Drehwinkel je Aufnahme 1° , die Wellenlänge $1,5418\text{\AA}$. Es wurde ein Bereich von 62° gemessen. Die Kristalle streuten bis zu einer maximalen Auflösung von $2,44\text{\AA}$.

Mit dem Programm MOSFLM wurden zunächst die Raumgruppe und Zellparameter bestimmt und verfeinert und die Daten integriert. Mit den Programmen SORTMTZ, SCALA, TRUNCATE und MTZ2VARIOUS aus der CCP4-Programmsuite wurde schließlich skaliert und reduziert.

Die Datenprozessierungsstatistik ist in Tabelle IV-14 zusammengefasst.

Die Zellkonstanten sind im Vergleich zu denjenigen des rF7a::BA Komplexes etwas kleiner (a und b: je 1\AA , c: 2\AA), was auf die veränderten Pufferbedingungen zurückzuführen ist. Resultierend aus den kleineren Zellkonstanten ist auch das Volumen der Einheitszelle erniedrigt und der Solvensanteil 2% geringer als im Ausgangskristall.

Tabelle IV-14: Datenprozessierungsstatistik für rF7a

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2
Zellkonstanten (\AA , $^\circ$)	
a	94,44
b	94,44
c	114,32
α	90
β	90
γ	90
Einheitszellenvolumen (\AA^3)	1019630
V_m ($\text{\AA}^3/\text{Da}$) (entspricht %H ₂ O)	3,55 (65%)
Anzahl der Komplexe pro asymmetrischer Einheit	1
Begrenzende Auflösung	2,44
Gemessene Reflexe	176203
Unabhängige Reflexe	18853
Vollständigkeit der Daten (%)	97,80%
letzte Schale	94,90%
Multiplizität	4,80
R_{merge}	11,30%
letzte Schale	65,80%

IV.3.3.3 Modellbau und Verfeinerung

Als Ausgangsmodell für die Verfeinerung wurden die Koordinaten von rF7a^{BA} (ohne BA, GOL und SO₄²⁻) verwendet und zunächst über eine *rigid body* Minimierung mit X-PLOR in die Dichte eingepasst. Direkt im Anschluss wurde eine Positionsverfeinerung für alle Atome in CNS durchgeführt. Der R-Faktor betrug nach dieser ersten Verfeinerung 24,5%, R_{free} 28,9%. Es folgten mehrere Zyklen von Modellbau (MAIN) und automatischer Verfeinerung (CNS), in deren Verlauf automatisch 77 Solvensmoleküle sowie manuell ein Ethylenglycolmolekül an der Position, an der im Ausgangsmodell das Glycerin gebunden war, eingebaut wurden, die individuellen B-Faktoren verfeinert und das Gewicht des kristallographischen Terms schrittweise erhöht wurde. Die Qualität des endgültigen Modells wurde mit den Pro-

grammen PROCHECK und WHATCHECK überprüft, der R-Faktor betrug 23,1% und R_{free} 28,6%. Die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells ist in Tabelle IV-15 zusammengefasst.

Tabelle IV-15: Verfeinerungsstatistik für rF7a

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich	8,0-2,44 Å
verwendete Reflexe	18262
Reflexe im Arbeitsset	16462
Reflexe im Testset	1800
R-Faktor (%)	23,11
R_{free} (%)	28,58
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen (Å)	0,02
Bindungswinkel (°)	2,07
r.m.s. B (Å ²)	1,59
Mittlerer B-Faktor	44,72
Hauptkettenatome (Å ²)	44,4
Seitenkettenatome (Å ²)	45,1
Wassermoleküle (Å ²)	37,5
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	
Nichtwasserstoffproteinatome	2357
Solvensmoleküle	77
Liganden	5
(Φ, Ψ) - Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich	81,80%
zusätzliche erlaubten Bereich	16,60%
weitläufig erlaubten Bereich	1,20%
verbotenen Bereich	0,40%

IV.3.3.4 Strukturbeschreibung

IV.3.3.4.1 Konformation der Aktivierungsdomäne von rF7a

Der Inhibitor Benzamidin ist in rF7a nicht mehr in der S1-Tasche gebunden, und auch die Oxyaniontasche ist nicht mehr durch eine Sulfation besetzt.

Die globale Konformation der S1-Tasche in rF7a ist unverändert. Bei genauerer Betrachtung werden jedoch einige Abweichungen im Bereich der Aktivierungsdomäne deutlich.

Während der Rand der S1-Tasche und die angrenzenden Bereiche der Aktivierungsdomäne in allen anderen FVIIa-Strukturen hoch konserviert und gut geordnet sind, ist dieser Bereich in rF7a etwas verschoben und offenbar flexibler, was sich in höheren Temperaturfaktoren widerspiegelt.

Die Peptidbindung zwischen Ser214 und Trp215 ist umgeklappt. Dadurch werden die Reste 215-224 um durchschnittlich 0,82 Å nach oben verschoben. Der Carbonylsauerstoff von Gly219 ist um 35° in die S1-Tasche hineingedreht. Über die Disulfidbrücke 220-191 wirkt sich die Verschiebung auch auf die Region 184-192 aus, hier beträgt die durchschnittliche Auslenkung der C_α nach oben 0,47 Å.

Die anderen Bereiche der Aktivierungsdomäne sind in rF7a im Vergleich zu rF7a^{BA} unverändert:

Der N-Terminus (Ile16) ist korrekt insertiert und stabilisiert die Konformation der katalytischen Triade durch Salzbrückenbildung zur Seitenkette von Asp194.

Auch der 140-Loop, welcher durch Wasserstoffbrückenbindung vom Hauptkettenstickstoff von Gln143 zum Carbonyl von Lys192 die Konformation der Oxyaniontasche stabilisiert, ist in rF7a unverändert, ebenso wie die Oxyaniontasche selbst.

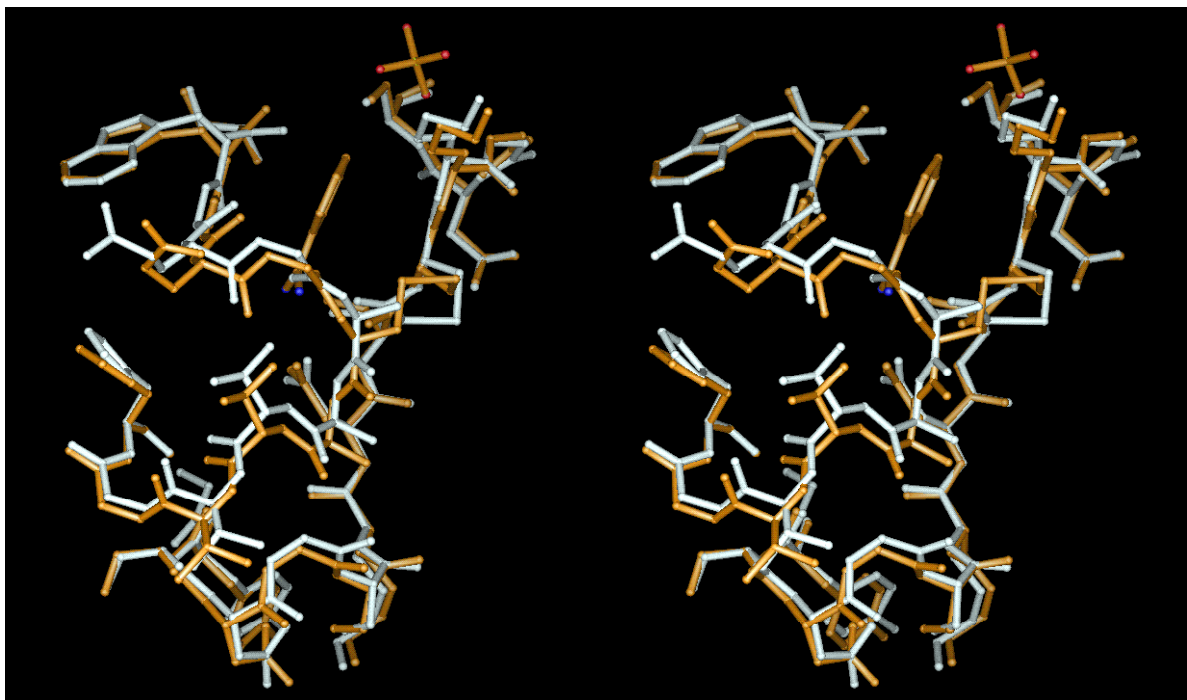


Abbildung IV-19: Überlagerung der Aktivierungsdomänen von rF7a^{BA} (orange) und rF7a (weiß). Gezeigt sind die Reste 214-225 und 184-195 sowie das im aktiven Zentrum von rF7a^{BA} gebundene Benzamidin und Sulfat. Der gezeigte Bereich ist in rF7a nach oben verschoben und weniger gut geordnet als in rF7a^{BA}.

IV.3.3.4.2 Konformation des 170-Loops von rF7a

Der 170-Loop ist in rF7a ungeordnet. Die Reste 170D bis 170I sind in der Elektronendichte nicht sichtbar. Sie wurden daher von der Verfeinerung ausgenommen und nicht in das Modell eingeschlossen. Die intermediäre Helix (165-170) ist leicht in Richtung des Met164 verschoben.

Das Sulfation (402), welches in rF7a^{BA} zwischen dem 170-Loop und der Aktivierungsdomäne gebunden hatte, ist in rF7a durch ein Wassermolekül ersetzt. Sulfat 403, welches in rF7a^{BA} am unteren Eingang der intermediären Helix gebunden hatte, ist in rF7a ebenfalls nicht mehr vorhanden. Die Tatsache, dass der *Soak*puffer kein Sulfat mehr enthalten hatte und an diesen Stellen nun keine Elektronendichte mehr vorhanden ist, bekräftigt, dass es sich in rF7a^{BA} tatsächlich um gebundene Sulfate gehandelt hatte.

Die Destabilisierung der Region 165-182 ist auf das Zusammenspiel mehrerer Effekte zurückzuführen: Einerseits fällt der stabilisierende Einfluss insbesondere von Sulfat 403 weg, andererseits wird die Region auch nicht mehr von der S1-Tasche her stabilisiert, da diese Region selber eine erhöhte Flexibilität aufweist. In der vorliegenden Kristallform befindet sich neben dem 170-Loop eine große Kavität. Die Schleife wird somit auch nicht durch Kristallkontakte stabilisiert. Nachdem auch die anderen stabilisierenden Einflüsse weggefallen sind und der Loop außerdem zum Teil gespalten ist, ist diese Region sehr beweglich, nimmt eine Vielzahl von Konformationen ein und ist in der Elektronendichte nicht mehr zu sehen.

IV.3.3.4.3 Ca²⁺-Bindeschleife und Zn²⁺-Bindung

Die Ca²⁺-Bindeschleife in rF7a ist unverändert. Weder hier noch an einer anderen Stelle im Protein konnten Zink-Ionen in die Elektronendichte eingepasst werden. Die von Petersen et al. (2000) postulierten Umlagerungen der Seitenketten von Lys25, His71 und His117 nach Zinkbindung wurden nicht beobachtet.

Der Versuch, mit höheren Konzentrationen an ZnCl₂ zu *soaken*, schlug mehrfach fehl, die Kristalle streuten dann überhaupt nicht mehr. Dies deutet darauf hin, dass die Zinkbindestelle im Kristall möglicherweise nicht gut zugänglich ist, höhere Zink-Konzentrationen notwendig sind, um die Bindestelle zu erreichen, und die Zinkbindung dann mit größeren Konformationsänderungen einher geht, die die Ordnung im Kristall zerstören.

Es ist nicht ausgeschlossen, dass diese Unordnung durch eine Umorientierung in der Ca²⁺-Bindeschleife verursacht wird, da diese in engem Kontakt mit der Region L108-L124 der EGF2-Domäne eines benachbarten rF7a-Moleküls steht.

IV.3.3.4.4 Konformation der EGF2-Domäne von rF7a

Die EGF2-Domäne von rF7a hat, wie auch bei rF7a^{BA}, einen höheren Temperaturfaktor als die katalytische Domäne (50 statt 44 Å²), ist also etwas schlechter geordnet.

Die Struktur der EGF2-Domäne ist variabler als die der katalytischen Domäne: die EGF2-Domänen von rF7a und rF7a^{BA} sind gut überlagerbar in den Bereichen, in denen sie in engem Kontakt mit der katalytischen Domäne stehen. Im Bereich von solvens exponierten Oberflächenschleifen hingegen sind Konformationsänderungen zu beobachten, die vermutlich auf die deutlich veränderten Solvensbedingungen zurückzuführen sind.

Die ersten sechs Reste (L84-L89) der EGF2-Domäne von rF7a sind nicht mehr sichtbar und wurden aus dem Modell entfernt.

IV.3.3.4.5 Ethylenglycol

In rF7a konnte an der Position, die in rF7a^{BA} durch ein Glycerinmolekül besetzt wird, ein Ethylenglycol (EG) in die Elektronendichte eingefügt werden (Abbildung IV-20).

Im Vergleich zum Glycerin sitzt das Ethylenglycol etwas tiefer in der Tasche und verdrängt das Wasser 562 (Abbildung IV-21). Das O2 von EG bildet direkt eine Wasserstoffbrücke zum O δ 1 Asp60 aus (3,11Å). In rF7a^{BA} wird die Interaktion des O1-GOL mit O δ Asp60 über das Wasser 562 vermittelt. Da O2-EG nicht ganz die Position des H₂O 562 einnimmt, kommt die Seitenkette des Asp60 dem O2-EG etwas (etwa 0,3Å) in die Tasche entgegen, um den Abstand zu verkürzen.

Eine weitere Interaktion, die das O2-EG im Gegensatz zu O1-GOL direkt und nicht über das Wasser 562 eingeht, ist eine Wasserstoffbrücke zum Carbonylsauerstoff des Ala56 (3,33Å).

Die 6 Reste lange Schleife Asp60 bis Trp61, die eine Seite der Tasche in welche die Alkohole binden, auskleidet, verläuft in rF7a etwas anders als in rF7a^{BA} und allen anderen publizierten FVIIa-Strukturen. Sie ist in rF7a etwas nach „rechts-unten“ (relativ zur Standardorientierung) gekippt. Diese Bewegung kann mit der Einwärtsbewegung des Asp60 in Richtung des EG zusammenhängen. Durch diese Bewegung wird der ganze Rest in die Tasche hineingezogen und die Position der nachfolgenden Reste mit beeinflusst.

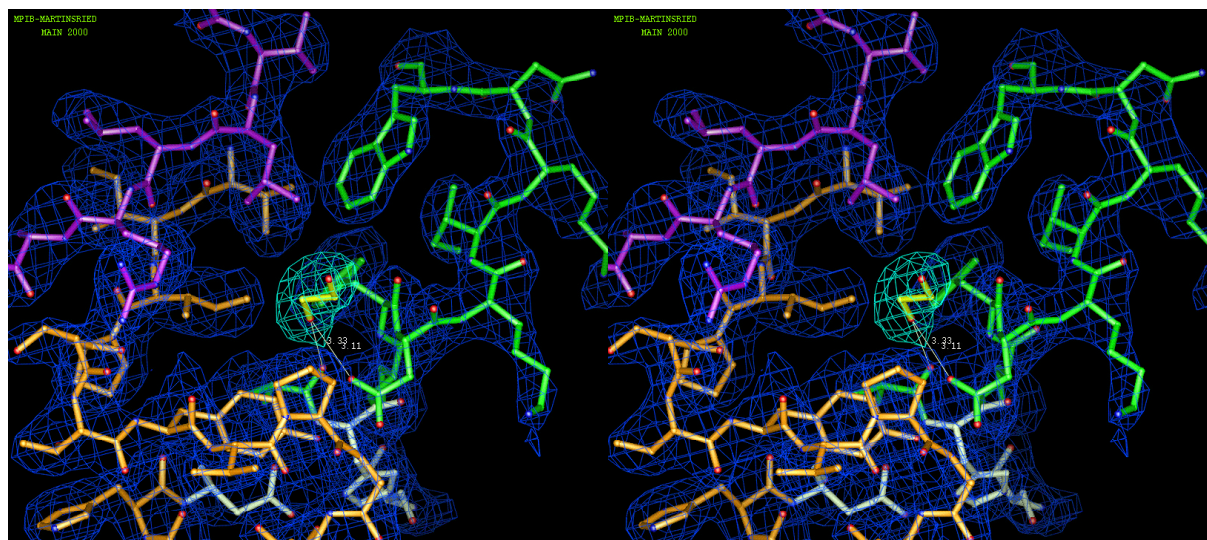


Abbildung IV-20: Bindung von Ethylenglycol (gelb) an rF7a. Gezeigt sind die Reste 56-61 (grün), 88-102 (orange) und 249-255 (lila). Die Reste der katalytischen Triade (57, 102, 195) sind weiß hervorgehoben. Die finale 2Fo-Fc-Elektronendichte ist 1 σ -konturiert eingezeichnet.



Abbildung IV-21: Überlagerung der Reste Asp60-Trp61 von rF7a^{BA} (weiß) und rF7a (orange) zusammen mit den jeweiligen Alkoholen. In rF7a ist das Wasser 562 von rF7a^{BA} (weiße Kugel) nicht mehr vorhanden, das Asp60 (links unten) bewegt sich auf das Ethylenglycol zu und die ganze Schleife ist etwas verkippt.

IV.3.3.4.6 Vergleich der Bindestellen für Ethylenglycol und Glycerin in rF7a, FIXa und FXa

Eine Überlagerung der Strukturen von FIXa (1rfn), FXa (1fax), rF7a^{BA} und rF7a im Bereich der Glycerin- bzw. Ethylenglycol-Bindestelle zeigte, dass die Bindung von EG oder GOL an dieser Position in FIXa ebenfalls durch eine Reihe von Wasserstoffbrücken stabilisiert werden kann. In FXa hingegen wäre eine solche Bindung durch die in die Bindestelle ragende Seitenkette von Lys90 behindert. Die Abstände der Alkohole zu relevanten Atomen in der Bindestelle sind in Tabelle IV-16 zusammengefasst. In Abbildung IV-22 ist eine Überlagerung der Bindestellen gezeigt.

Tabelle IV-16: Abstände von Ethylenglycol und Glycerin zu möglichen Bindepateern in FIXa und FXa

FIXa			FXa		
		Abstand			Abstand
Ethylenglycol			Ethylenglycol		
O2	O Ala56	3,10 Å	O2	Nζ Lys90	2,02 Å
O2	O Val59	2,46 Å	O1	OH Tyr60	2,62 Å
Glycerin			Glycerin		
O2	N Thr60A	2,01 Å	O1	Nζ Lys90	1,27 Å
O2	Oγ1 Thr60A	2,64 Å	O3	Nζ Lys90	3,16 Å
O2	O Val59	3,17 Å	O3	OH Tyr60	2,48 Å

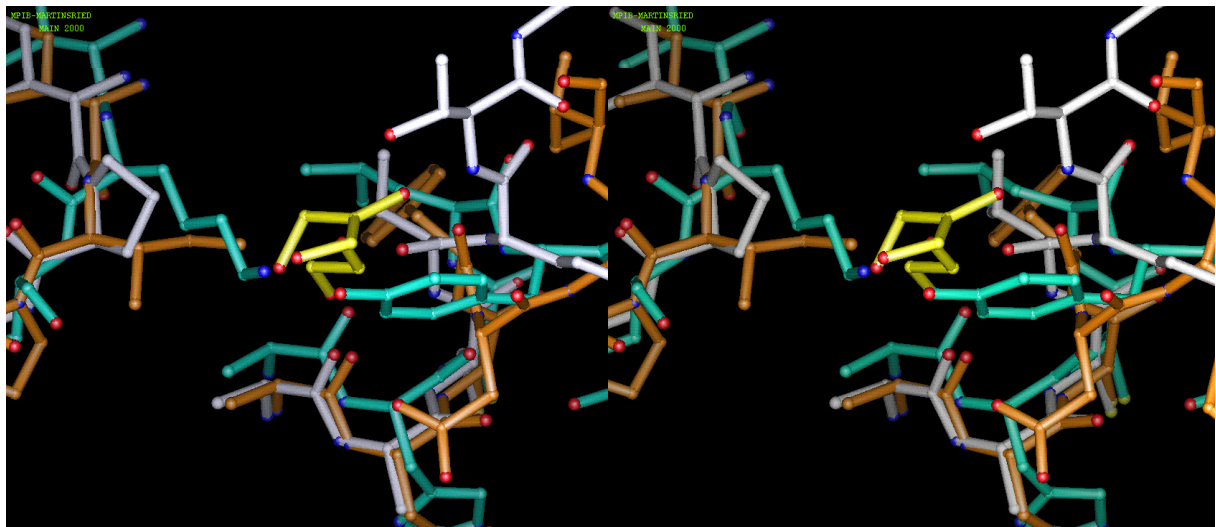


Abbildung IV-22: Überlagerung der Ethylenglycol/Glycerin (gelb)-Bindestelle in rF7a (orange), FIXa (weiß) und FXa (grün). Die Seitenketten von Lys90 und Tyr60 von FXa ragen weit in die potentielle Bindetasche und versperren den Platz für die Bindung der Alkohole.

IV.4 Angleich der S1-Tasche von rXYa an die S1-Tasche von FXa

IV.4.1 Herstellung, Aufreinigung und Aktivierung der Varianten von rF10a, rF9a, rXYa und Trypsin

Die Punktmutationen S190A in Trypsin, rXYa und rF9a sowie A190S in rF10a wurden wie in Material und Methoden beschrieben hergestellt. Die Expression, Aufreinigung, Aktivierung und Titration der Enzyme erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben. Alle Mutanten ließen sich mit ähnlichen Ausbeuten wie die Wildtypenzyme (10-60 mg reines Enzym je Liter *E. coli*-Fermentation) herstellen.

IV.4.2 Biochemische Untersuchung der Bedeutung von Serin/Alanin 190 für die amidolytische Aktivität von Trypsin, rXYa, rF10a und rF9a

Die Spezifität der S1-Tasche des chimären Enzyms rXYa sollte durch eine Punktmutation an Position 190 (S→A) an die S1-Tasche von Faktor Xa angeglichen werden. Um die Auswirkung dieser Mutation auf Reaktivität und Spezifität des Enzyms einschätzen zu können sowie einen genaueren Einblick in die Bedeutung von Rest 190 für die Substratbindung zu erhalten, wurde die äquivalente Mutation auch in rTrypsin (S→A), rF10a (A→S) und rF9a (S→A) eingeführt und analysiert.

Für rTry, rXYa, rF10a und die entsprechenden Mutanten wurden für eine Reihe kommerziell erhältlicher p-NA Peptidsubstrate die kinetischen Parameter k_{cat} , K_m und k_{cat}/K_m bestimmt. Der Großteil dieser Substrate besaß ein Arginin in der P1 Position und variable P2-P4-Reste. Zwei Substratpaare unterschieden sich jeweils in P1 durch einen Lysin- bzw. Argininrest, während die anderen Reste identisch waren.

Die amidolytische Aktivität von rF9a und rF9a S190A mit den getesteten Substraten war äußerst gering, sodass lediglich k_{cat}/K_m für die beiden Arginin-/Lysin-P1-Substratpaare bestimmt wurden. Diese Ergebnisse werden unten im Zusammenhang mit der Selektivität der S1-Tasche diskutiert.

Die für rTry, rXYa, rF10a und die entsprechenden Mutanten ermittelten k_{cat} , K_m und k_{cat}/K_m -Werte sind in Tabelle IV-17 im Überblick dargestellt. Die Entwicklung der k_{cat} , K_m und k_{cat}/K_m -Werte vom Ausgangs- zum mutierten Enzym, dargestellt als Quotient der jeweiligen Parameter, ist in Tabelle IV-18 verdeutlicht. Die Ergebnisse werden im Einzelnen in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert.

Tabelle IV-17 : Kinetische Parameter für die Hydrolyse einer Reihe von Substraten durch rTry S/A190, rXYa S/A190 und rF10a A/S190.

Substrat	rTry S190 (WT)							rTry A190			
	(P4)	P3	P2	P1	K_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	
S-2444	Pyro-	Glu-	Gly-	Arg-	pNA	184,1	159,7	1,15	281,3	388,1	0,72
S-2222	Bz ¹ -Ile-	Glu	Gly-	Arg-	pNA	138,0	57,5	2,40	233,2	109,1	2,14
Chr t-PA	MS- <i>D</i> -	Phe	Gly-	Arg-	pNA	167,6	30,4	5,51	211,4	51,0	4,15
Chr X	MOC- <i>D</i> -	Nle	Gly-	Arg-	pNA	157,5	32,7	4,82	192,6	56,4	3,42
Chr U	Bz- β -	Ala-	Gly-	Arg-	pNA	91,6	132,3	0,69	146,1	412,9	0,35
Chr Try	CB-	Val-	Gly-	Arg-	pNA	103,0	53,9	1,91	123,7	121,0	1,02
Chr PK	BZ-	Pro-	Phe-	Arg-	pNA	11,2	150,5	0,07	14,4	352,9	0,04
Chr GK	<i>D</i> -	Val-	CHA-	Arg-	pNA	30,4	110,0	0,28	61,6	330,1	0,19
Chr TH	Tos-	Gly-	Pro-	Arg-	pNA	106,7	16,5	6,48	145,8	30,8	4,74
Chr PL	Tos-	Gly-	Pro-	Lys-	pNA	19,1	13,5	1,42	27,0	137,8	0,20
S-2266	<i>D</i> -	Val-	Leu-	Arg-	pNA	26,6	139,0	0,19	67,0	603,7	0,11
S-2251	<i>D</i> -	Val-	Leu-	Lys-	pNA	11,6	499,1	0,0233	5,18	2176,0	0,0024

Substrat	rXYa S190 (WT)							rXYa A190			
	(P4)	P3	P2	P1	K_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	
S-2444	Pyro-	Glu-	Gly-	Arg-	pNA	47,3	37,8	1,25	95,0	137	0,69
S-2222	Bz-Ile-	Glu	Gly-	Arg-	pNA	43,5	16,3	2,67	113,1	91	1,24
Chr t-PA	MS- <i>D</i> -	Phe	Gly-	Arg-	pNA	46,3	9,3	4,96	130,5	40	3,25
Chr X	MOC- <i>D</i> -	Nle	Gly-	Arg-	pNA	54,3	13,2	4,12	133,5	50	2,66
Chr U	Bz- β -	Ala-	Gly-	Arg-	pNA	38,0	49,2	0,77	88,0	175	0,50
Chr Try	CB-	Val-	Gly-	Arg-	pNA	32,9	12,4	2,65	69,6	41	1,71
Chr PK	BZ-	Pro-	Phe-	Arg-	pNA	32,0	69,8	0,46	62,0	263	0,24
Chr GK	<i>D</i> -	Val-	CHA-	Arg-	pNA	58,8	38,5	1,53	107,6	158	0,68
Chr TH	Tos-	Gly-	Pro-	Arg-	pNA	35,6	23,5	1,51	82,3	92	0,89
Chr PL	Tos-	Gly-	Pro-	Lys-	pNA	70,0	116,0	0,60	32,2	633	0,05
S-2266	<i>D</i> -	Val-	Leu-	Arg-	pNA	27,1	117,8	0,23	80,5	642	0,13
S-2251	<i>D</i> -	Val-	Leu-	Lys-	pNA	75,2	1133	0,0663	57,9	14030	0,0041

Substrat	rF10a A190 (WT)							rF10a S190			
	(P4)	P3	P2	P1	K_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	K_{cat} (s^{-1})	K_M (μM)	K_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	
S-2444	Pyro-	Glu-	Gly-	Arg-	pNA	- ²	-	0,0310	-	-	0,0151
S-2222	Bz-Ile-	Glu	Gly-	Arg-	pNA	95,77	149	0,6445	59,66	230	0,2592
Chr t-PA	MS- <i>D</i> -	Phe	Gly-	Arg-	pNA	121,30	385	0,3152	71,97	491	0,1465
Chr X	MOC- <i>D</i> -	Nle	Gly-	Arg-	pNA	163,00	209	0,7788	99,88	251	0,3982
Chr U	Bz- β -	Ala-	Gly-	Arg-	pNA	29,30	475	0,0616	33,96	1315	0,0258
Chr Try	CB-	Val-	Gly-	Arg-	pNA	59,77	639	0,0936	57,97	1525	0,0380
Chr PK	BZ-	Pro-	Phe-	Arg-	pNA	11,12	965	0,0115	5,98	1327	0,0045
Chr GK	<i>D</i> -	Val-	CHA-	Arg-	pNA	35,14	1067	0,0329	37,24	2343	0,0159
Chr TH	Tos-	Gly-	Pro-	Arg-	pNA	71,81	203	0,3534	56,26	336	0,1673
Chr PL	Tos-	Gly-	Pro-	Lys-	pNA	37,73	966	0,0391	111,50	1820	0,0613
S-2266	<i>D</i> -	Val-	Leu-	Arg-	pNA	-	-	0,0187	36,77	3859	0,0095
S-2251	<i>D</i> -	Val-	Leu-	Lys-	pNA	-	-	0,00021	-	-	0,00054

¹ Abkürzungen: Bz, Benzyl; CB, Carbobenzoxy; CHA, Cyclohexylalanyl; MOC, Methoxycarbonyl; MS, Methylsulfonyl; pNA, p-Nitroanilin; Tos, Tosyl.

² Für diese Enzym-Substratkombinationen war K_M zu hoch, sodass lediglich die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_M , nicht jedoch die einzelnen Parameter bestimmt werden konnten.

Tabelle IV-18: Änderung der kinetischen Parameter von rTry S190→A190, rXYa S190→A190 und rF10a A190→S190 für die Hydrolyse einer Reihe von Substraten.

Substrat					rTry Mutante / WT			rXYa Mutante / WT			rF10a Mutante / WT			
	(P4)	P3	P2	P1	k _{cat}	K _M	K _{cat} /K _M	k _{cat}	K _M	K _{cat} /K _M	k _{cat}	K _M	K _{cat} /K _M	
S-2444	Pyro-	Glu-	Gly-	Arg-	pNA	1,53	2,43	0,63	2,01	3,64	0,55	-	-	0,49
S-2222	Bz-Ile-	Glu-	Gly-	Arg-	pNA	1,69	1,90	0,89	2,60	5,62	0,46	0,62	1,55	0,40
Chr t-PA	MS-D-	Phe	Gly-	Arg-	pNA	1,26	1,68	0,75	2,82	4,31	0,65	0,59	1,28	0,46
Chr X	MOC-D-	Nle	Gly-	Arg-	pNA	1,22	1,72	0,71	2,46	3,81	0,65	0,61	1,20	0,51
Chr U	Bz-β-	Ala-	Gly-	Arg-	pNA	1,60	3,12	0,51	2,32	3,55	0,65	1,16	2,77	0,42
Chr Try	CB-	Val-	Gly-	Arg-	pNA	1,20	2,25	0,53	2,11	3,28	0,64	0,97	2,39	0,41
Chr PK	BZ-	Pro-	Phe-	Arg-	pNA	1,28	2,34	0,55	1,94	3,77	0,51	0,54	1,38	0,39
Chr GK	D-	Val-	CHA-	Arg-	pNA	2,03	3,00	0,68	1,83	4,09	0,45	1,06	2,20	0,48
Chr TH	Tos-	Gly-	Pro-	Arg-	pNA	1,37	1,87	0,73	2,31	3,92	0,59	0,78	1,66	0,47
Chr PL	Tos-	Gly-	Pro-	Lys-	pNA	1,41	10,25	0,14	0,46	5,45	0,08	2,96	1,89	1,57
S-2266	D-	Val-	Leu-	Arg-	pNA	2,52	4,34	0,58	2,97	5,45	0,55	-	-	0,51
S-2251	D-	Val-	Leu-	Lys-	pNA	0,45	4,36	0,10	0,77	12,38	0,06	-	-	2,64
Durchschnittliche Änderung mit Arg in P1					1,57	2,47	0,66	2,34	4,14	0,57	0,79	1,80	0,45	

IV.4.2.1 Einfluss von Rest 190 auf das Selektivitätsprofil in S2-S4

Es sind mehrere Beispiele beschrieben, in denen Punktmutationen in Enzymen entweder nicht ausreichten, um die erwartete Eigenschaft zu erzeugen (z.B. Hedstrom et al., 1992), oder aber völlig unerwartete Wirkungen durch Einführung oder Beseitigung von weiterreichenden Wechselwirkungen hatten (z.B. Groll et al., 1999).

Vor diesem Hintergrund wurde zunächst überprüft, ob die Mutagenese von Rest 190 in der S1-Tasche das Selektivitätsprofil der betrachteten Proteasen in den Bindestellen S2 bis S4 beeinflusst hatte. Zu diesem Zweck wurde die Reaktivität der Enzyme mit einer Reihe von Substraten untersucht, die sich in P2-P4 unterschieden, in P1 jedoch identisch waren (Arginin). Es wurde verglichen, ob sich die relativen Reaktivitäten für die verschiedenen Substrate, also das Selektivitätsprofil, durch die Mutation verändert hatten (Daten siehe Tabelle IV-17).

Bei allen mutierten Enzymen war mit den P1-Arginin-Substraten eine Abnahme der Reaktivität auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes zu beobachten. Die mittlere Abnahme war am größten bei rF10 (45%), etwas weniger groß bei rXY (57%) und am geringsten bei Trypsin (66%, Tabelle IV-18).

Im Detail war bei **Trypsin** eine leichte Steigerung der k_{cat} -Werte (im Mittel 157%), einhergehend mit erhöhten K_{m} -Werten festzustellen (247%). Die Nettoabnahme der Reaktivität ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) wurde durch die vergleichsweise höhere Steigerung der K_{m} -Werte bedingt.

Bei **rXYa** fiel sowohl die Steigerung von k_{cat} als auch von K_{m} etwas höher aus als bei Trypsin (234 bzw. 414%). Auch hier resultierte die Nettoabnahme der Reaktivität aus der stärkeren Zunahme von K_{m} .

In der **rF10a**-Mutante waren die k_{cat} -Werte leicht erniedrigt (79%), während die K_{m} -Werte leicht anstiegen (180%), was wiederum in einer Reaktivitätsabnahme resultierte.

Eine Analyse der absoluten Werte für k_{cat} , K_{m} und $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ bei den verschiedenen Enzymen verdeutlichte, weshalb die Reaktivität von rF10a um etwa eine Größenordnung unter derjenigen von Trypsin und rXYa liegt. Die k_{cat} -Werte für alle Enzyme befinden sich in der gleichen Größenordnung, jedoch sind die K_{m} -Werte von rF10a deutlich höher als die von Trypsin und rXYa. Die niedrige Reaktivität von rF10a ist also durch seine im Vergleich zu Trypsin und rXYa hohen K_{m} -Werte erklärbar.

In Abbildung IV-23 sind die Reaktivitäten der Enzyme mit verschiedenen Substraten, für jedes Enzym normiert auf die Reaktivität mit Chr PK (das Substrat, welches von rTry und rF10a am schlechtesten hydrolysiert wurde), dargestellt. Es wird deutlich, dass die Reaktivität mit den verschiedenen Substraten um bis zu 2 Größenordnungen variiert. Die Selektivität für die Substrate blieb innerhalb eines Enzympaars vergleichbar (ausgedrückt als der Quotient der normierten Reaktivitäten von Mutante und WT) und schwankte lediglich maximal um den Faktor 1,67, obgleich die absoluten Aktivitäten der Enzyme mit den Substraten sich durchaus verändert hatten (vgl. Tabelle IV-17 und Tabelle IV-18).

Die Konstanz des Selektivitätsprofils deutet darauf hin, dass die Auswirkungen der Mutationen von Rest 190 auf die Interaktion mit dem P1-Rest beschränkt bleiben und die anderen Bindestellen durch die Punktmutation nicht beeinflusst wurden. Dieses Ergebnis wurde auch durch die Röntgenstrukturanalyse von rXYa S190A bestätigt (siehe IV.5).

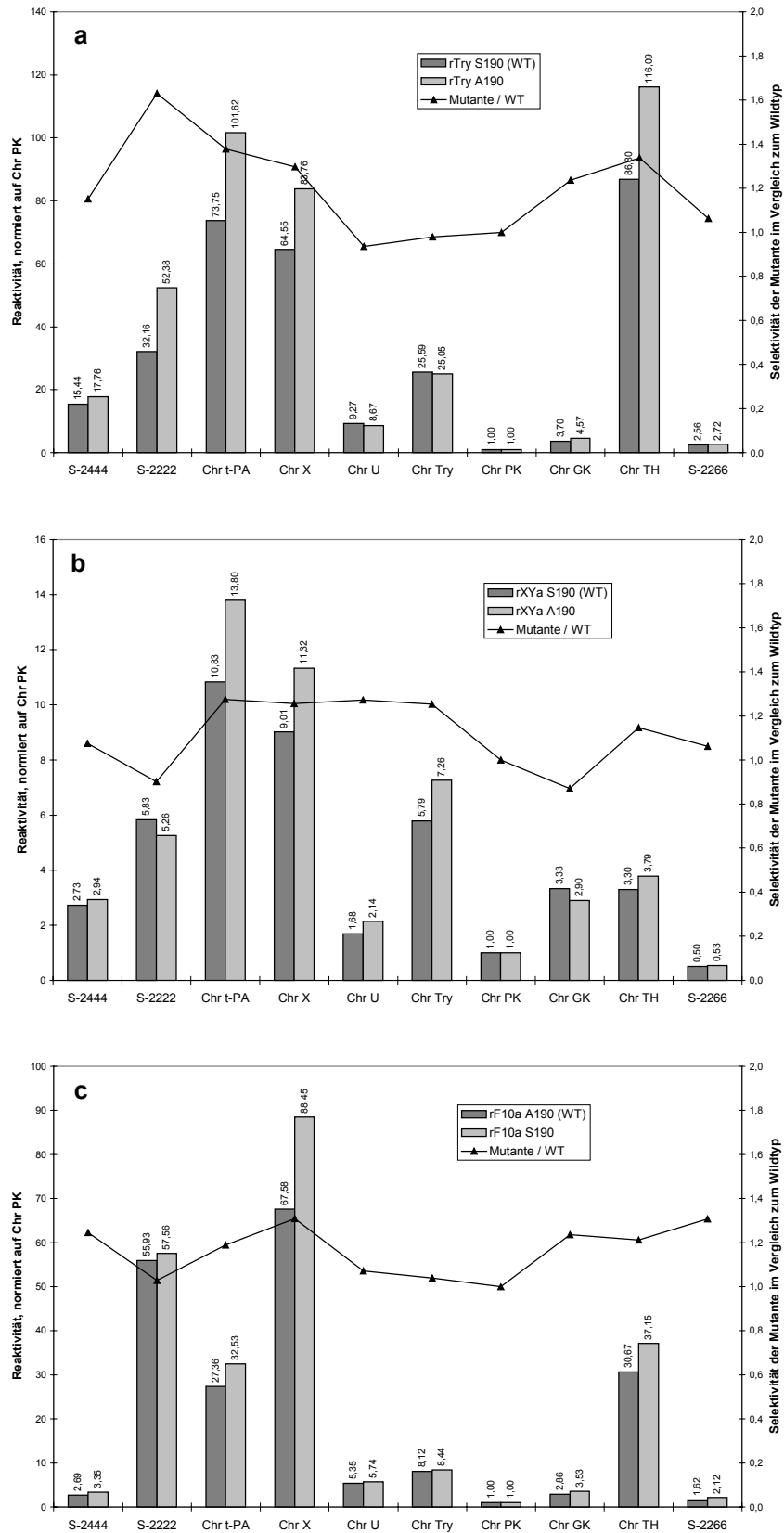


Abbildung IV-23: Selektivitätsprofile für die Enzyme Trypsin S/A190 (a), rXYa S/A190 (b) und rF10a A/S 190 (c) mit einer Reihe von P1-Arg-Substraten. Beschreibung siehe Text.

IV.4.2.2 Einfluss von Rest 190 auf die Arginin- und Lysin- Selektivität der S1-Tasche in Trypsin, rXYa, rF10a und rF9a

IV.4.2.2.1 Selektivitätsänderung in der S1-Tasche durch Ser/Ala 190

Der Einfluss von Serin und Alanin 190 auf die Selektivität für Arginin- oder Lysin-Substratseitenketten in der S1-Tasche der Enzyme Trypsin, rXYa, rF10a und rF9a wurde mit Hilfe zweier Substratpaare, die sich jeweils durch einen Arginin- oder Lysin-Rest in der P1 Position unterschieden, genauer untersucht (Tabelle IV-19).

In Tabelle IV-20 sind die ermittelten Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_M) dargestellt. Die Selektivität innerhalb eines Substratpaares ist gegeben durch den Quotienten der Spezifitätskonstanten für das jeweilige Arginin- und Lysinsubstrat. Die Veränderung der Selektivität errechnet sich aus dem Quotienten der Selektivitäten des Ala190 vs. Ser190 -Enzyms.

Tabelle IV-19: Substratpaare mit Arginin / Lysin in P1

Handelsname	Aufbau	Abkürzung
Chromozym TH	Tos-Gly-L-Pro-L-Arg-pNA	tGPR
Chromozym PL	Tos-Gly-L-Pro-L-Lys-pNA	tGPK
S-2266	H-D-Val-L-Leu-L-Arg-pNA	VLR
S-2251	H-D-Val-L-Leu-L-Lys-pNA	VLK

Tabelle IV-20: Änderung der Spezifitätskonstanten und der Selektivität für zwei Arginin-/Lysin-P1-Substratpaare in Abhängigkeit von Rest 190 in Trypsin, rXYa, rF10a und rF9a.

	tGPR k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	tGPK k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	Selektivität Arg/Lys	VLR k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	VLK k_{cat}/K_M ($s^{-1} \mu M^{-1}$)	Selektivität Arg/Lys
rTry S190 (WT)	6,48	1,42	4,6	0,19	0,0233	8,2
rTry A190	4,74	0,20	24,2	0,11	0,0024	46,6
rTry A190 / rTry S190 Zunahme der P1-Arg-Selektivität	0,73	0,14	5,3	0,58	0,10	5,7
rXYa S190 (WT)	1,51	0,60	2,5	0,23	0,0663	3,5
rXYa A190	0,89	0,05	17,5	0,13	0,0041	30,4
rXYa A190 / rXYa S190 Zunahme der P1-Arg-Selektivität	0,59	0,08	7,0	0,55	0,06	8,8
rF10a S190	0,17	0,06	2,7	0,01	0,0005	17,6
rF10a A190 (WT)	0,35	0,04	9,0	0,02	0,0002	91,0
rF10a A190 / rF10a S190 Abnahme der P1-Arg-Selektivität	2,11	0,64	3,3	1,96	0,38	5,2
rF9a S190 (WT)	$1,96 \times 10^{-5}$	$5,76 \times 10^{-7}$	34,1	$2,45 \times 10^{-5}$	$6,11 \times 10^{-7}$	40,0
rF9a A190	$3,93 \times 10^{-5}$	$2,28 \times 10^{-7}$	172,3	$4,67 \times 10^{-5}$	$2,42 \times 10^{-7}$	193,1
rF9a A190 / rF9a S190 Zunahme der P1-Arg-Selektivität	2,00	0,40	5,1	1,91	0,40	4,8

Der Einfluss von Rest 190 auf die Selektivität für Arginin- oder Lysinseitenketten ist bei allen betrachteten Enzymen und beiden Substratpaaren vergleichbar: Die Selektivität für Arginin ist in den Enzymen mit Ala190 jeweils durchschnittlich 5,5 mal so hoch wie in den entsprechenden Ser190-Enzymen.

Diese Selektivitätsänderung ist überall vergleichbar, obwohl die Enzyme sowohl in ihrer Reaktivität mit den Substraten als auch in ihrer Wildtypselektivität stark divergieren.

Das Substratpaar VLX wird von den Enzymen Trypsin, rXYa und rF10a etwa zehnmal schlechter hydrolysiert als das Substratpaar tGPX. Gleichzeitig ist die Selektivität für Arginin bei diesem Substratpaar (VLX) höher. Offenbar hat bei Substraten, die insgesamt weniger gut stabilisiert werden, die Bindung in S1 einen größeren Anteil an der gesamten Bindung des Substrats. Unterschiede in der Affinität der S1-Tasche für den P1-Rest resultieren dann in größeren Selektivitätsunterschieden. Die Selektivitätsänderung von Ser190 → Ala190 ist jedoch für beide Substratpaare ähnlich.

In rF9 WT und rF9 Ala190 sind Selektivität und Reaktivität für beide Substratpaare vergleichbar. Im Vergleich mit der Reaktivität der anderen drei Enzymen ist die Reaktivität von rF9a um mehrere Größenordnungen niedriger. Die Selektivität für Arginin ist im Vergleich aller untersuchten Enzymen beim rF9-Paar mit Abstand am höchsten, während die Selektivitätsänderung durch die Punktmutation sich im üblichen Rahmen bewegt (5-fach).

IV.4.2.2.2 Einfluss von Ser/Ala 190 auf die Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m

Die Änderung der Selektivität für Arginin ist auf unterschiedlich starke Änderungen der Spezifitätskonstanten (k_{cat}/K_m) der mutierten Enzyme zurückzuführen (Tabelle IV-20).

In den **Trypsin**- und **rXY**- Mutanten (S→A) beträgt die Reaktivität gegenüber den Arginin-substraten noch etwa 60% der Ausgangsreaktivität, während die Reaktivität gegen Lysin-substrate auf etwa 10% reduziert ist.

In **rF10** wird durch die A→S Mutation die Selektivität für Arginin verschlechtert. Der k_{cat}/K_m -Wert für Arginin-Substrate halbiert sich, für Lysin-Substrate hingegen steigt er an.

In **rF9a** ist die relative Entwicklung der Aktivität von Ser190 zum Ala190 Enzym quasi identisch mit der Situation in rF10: Bei der Mutante (A190) ist die Reaktivität gegen Arginin-Substrate verdoppelt, die gegen Lysin-Substrate auf 40% reduziert.

IV.4.2.2.3 Genauere Analyse der kinetischen Parameter k_{cat} und K_m in Abhängigkeit von Ser/Ala 190

Eine genauere Betrachtung der einzelnen kinetischen Parameter k_{cat} und K_m und ihrer Veränderungen in Abhängigkeit von Substrat und Mutation kann Aufschluss über die Ursachen der Selektivitätsänderung geben (Tabelle IV-21).

Die Selektivitätszunahme der **Trypsin**-Mutante für das Arginin-Substrat setzt sich bei den beiden untersuchten Substratpaaren unterschiedlich zusammen.

Bei GPX, dem bevorzugten Substratpaar, ist der K_m -Wert für beide Substrate im Wildtyp-Enzym sehr ähnlich. Die Selektivität rührt hier von unterschiedlichen k_{cat} -Werten her. Im Ala190 Enzym steigen die k_{cat} -Werte für beide Substrate um einen ähnlichen Faktor an (140%). Die K_m -Werte hingegen entwickeln sich auseinander. Die Selektivitätsänderung ist auf die starke Verschlechterung des K_m -Wertes für GPK in der Mutante zurückzuführen.

Bei VLX sind die Spezifitätskonstanten etwas anders zusammengesetzt: Hier sind im Wildtyp-Enzym sowohl k_{cat} als auch K_m für VLR günstiger als für VLK. Die K_m -Werte ändern sich in der Mutante für beide Substrate um den gleichen Faktor, während k_{cat} für VLR besser, für VLK schlechter wird. Im Gegensatz zu GPX ist hier die Selektivitätsänderung also hauptsächlich auf die gegenläufige Entwicklung der k_{cat} zurückzuführen.

Bei **rXYa** verläuft die Entwicklung für beide Substratpaare analog: Für beide Arginin-Substrate steigen in der Mutante sowohl k_{cat} als auch K_m an, die resultierende Aktivität des Ala190-Enzyms beträgt noch etwa 55% der Ausgangsaktivität. Bei den Lysin-Substraten sinkt k_{cat} , während K_m stärker ansteigt als bei den Arginin-Substraten und die resultierende Aktivität nur noch 6-8% des Ausgangswertes beträgt. Interessanterweise sind die k_{cat} -Werte für die Lysin-Substrate im Ser190 Enzym größer als für die Arginin-Substrate, im Ala190 Enzym jedoch kleiner, während die K_m -Werte für die Lysin-Substrate immer über denen für die Arginin-Substrate liegen. Weiterhin haben die k_{cat} -Werte der XXR bzw. XXK -Substrate für ein gegebenes Enzym einen vergleichbaren Wert.

Bei **rF10a** verläuft die Entwicklung der k_{cat} -Werte ähnlich wie bei rXY (Ala190: R>K, Ser190: K>R). Die K_m -Werte sind in der Mutante (Ser190) erhöht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die K_m -Werte in allen Mutanten immer verschlechtert sind. Jeder Eingriff in die S1-Tasche verursacht demnach Veränderungen, die die empfindliche Konformation der Bindetasche leicht stören und ungeachtet anderer Effekte die Bindung von Substraten beeinträchtigen.

Die k_{cat} -Werte hingegen entwickeln sich unabhängig von den K_m -Werten: Sie sind in allen Ala190-Enzymen für die XXR- Substrate erhöht, für die XXK-Substrate erniedrigt (Ausnahme: rTry Ala190 mit GPK).

Die Einführung der Punktmutation S190A in rXYa hatte eine Veränderung der Arg/Lys Selektivität in Richtung derjenigen von rF10a zu Folge. Somit ist diese Mutation geeignet, das Faktor Xa- Kristallisationsmodell rXY weiter an das Zielenzym anzupassen.

IV.5 Röntgenstrukturanalyse von rXYa S190A

IV.5.1 Kristallisation von rXYa S190A

rXYa S190A wurde im Komplex mit dem Faktor Xa-Inhibitor „34755“ der Firma Organon kristallisiert.

Dazu wurde das Protein gegen 1mM HCl dialysiert, auf 17mg/ml aufkonzentriert und anschließend auf 1mM Inhibitor 34755 (gelöst in H₂O) eingestellt. Die Kristallisation wurde im Dampfdiffusionsverfahren nach der *sitting drop* Methode durchgeführt (1,5µl Protein + 1,5µl Reservoir). Geeignete Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation der von Hopfner (1997) für PPACK-inhibierten rXYa gefundenen Bedingungen ermittelt und waren wie folgt:

0.1M MES/Tris, pH 8.6, 10% PEG 6000, 4°C.

Die Kristalle wuchsen innerhalb von 2 bis 3 Wochen.

Die Struktur des Komplexes rXYa S190A::34755 wurde bis zu einer Auflösung von 2,1Å gelöst und wird im Folgenden beschrieben.

IV.5.2 Datensammlung und Pattersonsuche

Die Diffraktionsdaten wurden an einem einzigen Kristall gemessen. Die Datensammlung erfolgte bei 4°C auf einem Xentronics-Detektor (Siemens-Bruker), der auf einem Rigaku RU300-Generator montiert war.

Die Kristalle streuten bis zu einer maximalen Auflösung von 2,1Å.

Die Daten wurde mit dem Programm SAINT (Howard et al., 1987) indiziert und mit dem Programm XDS reduziert. Die Datenprozessierungsstatistik ist in Tabelle IV-22 zusammengefasst.

Die Lage des Proteinmoleküls in der Elementarzelle wurde über Pattersonsuche mit dem Programm AMoRe (Navaza, 1994) unter Verwendung der Daten mit einer Auflösung von 10-3,5 Å bestimmt. Als Suchmodell wurden die Koordinaten von PPACK-rXYa verwendet (PDB-Eintrag 1fxy, Hopfner et al., 1998). Die Rotationssuche ergab eine eindeutige Lösung mit einem Korrelationskoeffizienten von 30,9%, die Translationssuche ergab eine Lösung mit einem Korrelationskoeffizienten von 58,8% über der zweiten Lösung mit 35,3%. Der kristallographische R-Faktor betrug 35,8%.

Tabelle IV-22: Datenprozessierungsstatistik für rXYa S190A³⁴⁷⁵⁵

DATENSAMMLUNG	
Raumgruppe	P2 ₁
Zellkonstanten (Å, °)	
a	37,12
b	75,04
c	41,27
α	90,00
β	94,96
γ	90,00
Einheitszellenvolumen (Å ³)	114524
V _m (Å ³ /Da) (entspricht %H ₂ O)	2,29 (46%)
Anzahl der Komplexe pro asymmetrischer Einheit	1
Begrenzende Auflösung	2,10
Gemessene Reflexe	17272
Unabhängige Reflexe	10801
Vollständigkeit der Daten	81,50%
letzte Schale	62,80%
Multiplizität	1,60
R _{merge}	4,90%
letzte Schale	25,90%

IV.5.3 Modellbau und Verfeinerung

Das Modell für rXYa S190A³⁴⁷⁵⁵ wurde unter Verwendung der Programme X-PLOR (Version 3.851, Brünger 1992a) und CNS (Version 0.3, Brünger et al., 1998) verfeinert.

Zunächst wurde die in der Pattersonsuche gefundene Orientierung des Proteins mit Hilfe der *rigid body*-Minimierung in X-PLOR unter Verwendung der Reflexe von 8-2,5 Å verfeinert. Es folgte *rigid body*-Minimierung, in der die beiden Subdomänen (16-121, 122-246) unabhängig voneinander verfeinert wurden, anschließend eine weitere *rigid body*-Minimierung unter Verwendung der Reflexe bis 2,1 Å, bei der das Protein in insgesamt 21 Gruppen, bestehend aus Helices oder gerade verlaufenden Hauptkettenanteilen, aufgeteilt wurde. Nach einer Positionsverfeinerung für alle Atome betrug der R-Faktor 29,7%, der freie R-Faktor 36,9%. Das verfeinerte Modell wurde benutzt, um eine 2Fo-Fc Elektronendichte zu berechnen. In diese Elektronendichte wurde mit Hilfe des Programms MAIN das Modell manuell weiter eingepasst und wieder automatisch in X-PLOR verfeinert. Nach mehreren Zyklen der manuellen und automatischen Verfeinerung, in deren Verlauf auch manuell Wasser eingepasst und der Inhibitor eingebaut wurden, betrug der R-Faktor 21,2%, der freie R-Faktor 30,9%. An diesem Punkt wurde die automatische Verfeinerung mit dem Programm CNS fortgesetzt. Solvensmoleküle wurden automatisch gelöscht und eingebaut, die Atompositionen nach dem *maximum likelihood*-Target verfeinert, die individuellen B-Faktoren verfeinert und schrittweise das Gewicht des kristallographischen Terms erhöht. Die Qualität des verfeinerten Modells wurde mit den Programmen PROCHECK und WHATCHECK überprüft. Die Verfeinerungsstatistik des endgültigen Modells ist Tabelle IV-23 zusammengefasst.

Tabelle IV-23: Verfeinerungsstatistik für rXYa S190A³⁴⁷⁵⁵

VERFEINERUNG	
Auflösungsbereich	50,0 - 2,1 Å
verwendete Reflexe	10770
Reflexe im Arbeitsset	10205
Reflexe im Testset	565
R-Faktor (%)	17,87
R _{free} (%)	24,52
r.m.s.-Abweichungen von Idealwerten der	
Bindungslängen (Å)	0,018
Bindungswinkel (°)	1,875
r.m.s. B (Å ²)	1,80
Mittlerer B-Faktor	35,39
Hauptkettenatome (Å ²)	33,16
Seitenkettenatome (Å ²)	33,56
Wassermoleküle (Å ²)	40,56
Anzahl der Atome in der asymmetrischen Einheit	
Nichtwasserstoffproteinatome	1729
Nichtwasserstoffinhibitoratome	34
Solventmoleküle	85
(Φ, Ψ) - Winkel Verteilung im	
bevorzugten Bereich	85,70%
zusätzliche erlaubten Bereich	14,30%
weitläufig erlaubten Bereich	0,00%
verbotenen Bereich	0,00%

IV.5.4 Strukturbeschreibung

IV.5.4.1 Allgemeine Beschreibung

Der Komplex von rXYa S190A mit dem Inhibitor 34755 (im folgenden kurz XY190 genannt) kristallisierte in einer anderen Raumgruppe als PPACK-rXYa (im folgenden kurz XY), nämlich in $P2_1$ statt in $C2$.

XY190 wies trotz anderer Kristallform die gleiche globale Konformation auf wie das kovalent inhibierte „Wildtyp“-Modell: Das chimäre Protein besteht aus zwei β -Fass Subdomänen (Reste 16-121: von Faktor Xa abgeleitet, Reste 122-246: von Trypsin abgeleitet), die an ihrer Kontaktfläche das aktive Zentrum und die Substratbindungsregion ausbilden (Abbildung IV-24).

Insbesondere die Substratbindungsregion und die Domänenkontaktfläche, also das „Herz“ des Enzyms, sind in der Elektronendichte gut definiert und im Vergleich mit dem Modell konserviert. Einige Abweichungen, die auf die Bindung der unterschiedlichen Inhibitoren zurückzuführen sind, werden in Abschnitt IV.5.4.2 diskutiert.

Einige Oberflächenschleifen von XY190 sind anders orientiert als in XY. Der Ca^{2+} -Bindeloop, welcher bereits in XY eine andere Konformation als in Trypsin und FXa eingenommen hatte, ist wiederum etwas anders angeordnet und hat relativ hohe Temperaturfaktoren, was auf eine gewisse Flexibilität hindeutet (vgl. Abschnitt IV.5.4.4). Diese Abweichung von der XY-Struktur ist allerdings auf Packungseffekte zurückzuführen.

Die Punktmutation (S190A) in der S1-Tasche hatte keine weitreichenden Umlagerungen zur Folge. Die Konformation der S1-Tasche ist in XY190 wie in den verwandten Enzymen hoch konserviert, mit einer RMS-Abweichung der C_α von 0,63Å, 0,52Å und 0,77Å im Vergleich zu FXa, Trypsin und dem Modell XYa.

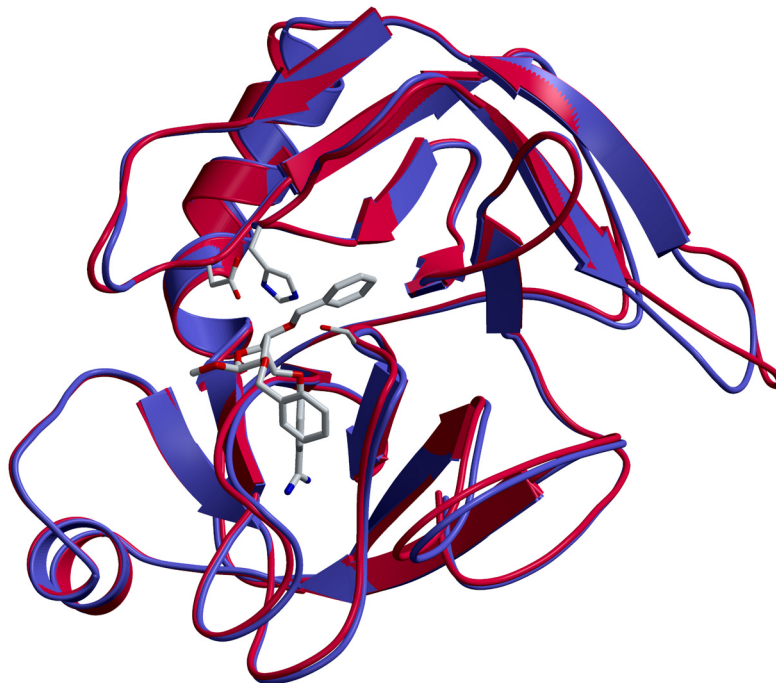


Abbildung IV-24: Überlagerung der Strukturen von XY (rot) und XY190 (blau). Der Inhibitor 34755 und die Reste der katalytischen Triade von XY190 sind als Stäbchen, die Proteine als Bänder dargestellt. Rechts ist die variable Ca^{2+} -Bindeschleife zu erkennen, die restliche Struktur ist gut überlagerbar.

IV.5.4.2 Wechselwirkung des FXa-Inhibitors 34755 mit dem aktiven Zentrum

Der Inhibitor 34755 besteht aus einem Furanring mit 4 Substituenten: eine benzamidinartige Gruppe, zwei Phenylringe und ein Methylether.

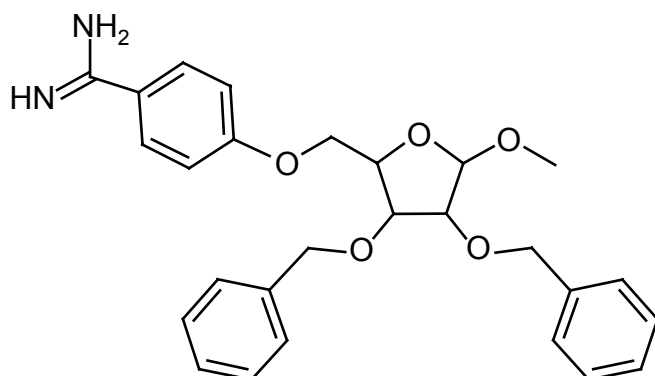


Abbildung IV-25: Strukturformel des FXa-Inhibitors 34755

Die Benzamidin-Gruppe des Inhibitors bindet in die S1-Tasche des Enzyms. Der Furanring besetzt die S2-Bindestelle, einer der Phenylringe bindet in S3, ein weiterer in S1', während die Ethergruppe in Richtung der S4 Tasche zeigt, ohne diese jedoch auszufüllen (Abbildung IV-26).

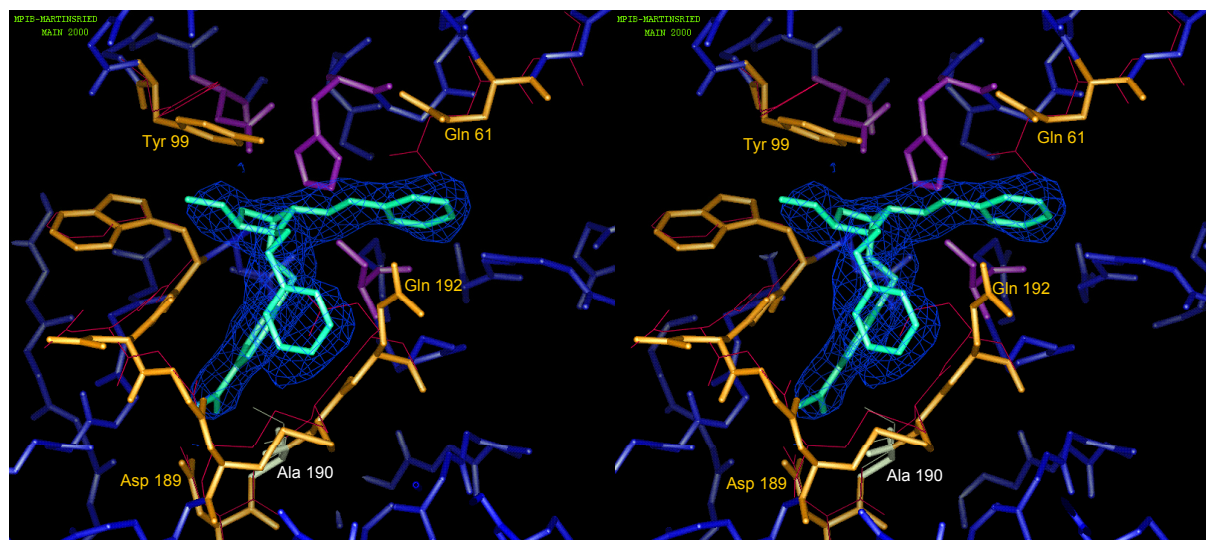


Abbildung IV-26: Bindung des Inhibitors 34755 (grün) in das aktive Zentrum von XY190. Die Reste der katalytischen Triade sind violett dargestellt, die Umrandung der S1-Tasche und die im Text erwähnten Reste orange, das mutierte Ala190 weiß. In Dunkelblau ist der weitere Verlauf der Hauptkette des Enzyms angezeigt. Die dünnen roten Linien geben den Verlauf der entsprechenden Reste in XY an. Für den Inhibitor ist zusätzlich die finale 2Fo-Fc-Elektronendichte (1,0 σ -konturiert) gezeigt.

Die Benzamidin-Gruppe wird über Salzbrücken des Amidins mit den beiden O δ -Atomen von Asp189 stabilisiert. Diese Twin-Twin-Anordnung ist typisch für die Bindung von Benzamidin in Serinproteinasen.

Die Position der Benzamidin-Gruppe weicht gegenüber der Position von Benzamidin-Gruppen in FXa und Trypsin um lediglich 0,7Å ab. Diese Abweichung liegt im Bereich der RMS-Abweichung der verwandten Enzyme zu XY190.

Bemerkenswert ist die Konformation der Seitenkette von Tyr99 in der beschriebenen Struktur: Es nimmt eine „relaxierte“ Konformation ein, vergleichbar mit der Situation in den bekannten Strukturen von Faktor Xa. In der PPACK-inhibierten XY-Struktur war die Tyrosinseitenkette um 45° in Richtung der S4-Tasche gedreht. Diese unterschiedliche Konformation kann durch die verschiedenen Inhibitorgruppen in S2 erklärt werden: In der vorliegenden Struktur wird S2 durch einen flach in der Tasche liegenden Furanring besetzt, während in der XY-Struktur diese Position durch das kovalent gebundene und aufrecht stehende Prolin des Inhibitors eingenommen und das Tyrosin verdrängt wurde.

Die Seitenkette von Gln192 ist in XY190 um 50° gedreht und um $3,3\text{\AA}$ in Richtung der S1'-Tasche verschoben. Diese Bewegung ist eine Antwort auf die Bindung der beiden Phenylreste des Inhibitors in die S3 und S1'-Taschen. Phenylring 1 verdrängt die Glutaminseitenkette aus der S3-Bindestelle. Die Seitenkette ist nun genau zwischen den beiden Phenylresten positioniert, welche „sattelförmig“ auf ihr sitzen.

Die Bindung in der S3-Bindestelle erfolgt bei peptidischen Substraten/Inhibitoren normalerweise über die Hauptkette des Substrats, die Seitenkette ist solvensexponiert. Bei geeigneter Stereochemie des Inhibitors kann jedoch, wie im vorliegenden Fall, die hydrophobe Tasche, die durch die Reste 191-192 und 215-220 gebildet wird, für die Bindung ausgenutzt werden.

Phenylring 2 ist zwischen den aliphatischen Anteilen der Seitenketten der Glutamine 61 und 192 gebunden, wobei auch die Seitenkette von Gln61 im Vergleich zu XY um 72° verdreht ist und nun eher der in FXa-Strukturen beobachteten Konformation entspricht. Die hydrophobe Wechselwirkung der Seitenkette mit dem Ring ist hier optimiert, da der polare Kopf der Seitenkette von Gln61 nicht zum P1'-Ring zeigt, sondern um 2\AA aus der Tasche bewegt wurde. Vor allem die Seitenketten verleihen dem 60-Loop somit die notwendige Plastizität, um auch aromatische P1'-Reste zu binden.

IV.5.4.3 Vergleich der Substratbinderegion von XY190 mit derjenigen von Faktor Xa und Trypsin

XY190 ist ein chimäres Protein, dessen beide Untereinheiten von Faktor Xa bzw. Trypsin stammen. Das katalytische Zentrum und die Substratbindungsregion werden von Resten beider Untereinheiten gebildet. Trotzdem weist die Struktur der Substratbinderegion in wichtigen Bereichen FXa-Merkmale auf.

Die **S1-Tasche** wird hauptsächlich von Trypsin-Resten gebildet. Diese Region ist unter den trypsinartigen Serinproteasen stark konserviert, sodass die Konformation dieser Tasche für alle drei Enzyme (Trypsin, FXa, XY/XY190) weitgehend identisch ist. Der gravierendste Unterschied, die Position 190, wurde im vorliegenden Enzym an die Situation in FXa angepasst.

Die **S2-Tasche** wird von den Oberflächenschleifen um die Reste 60 und 99 begrenzt, welche in XY190 von FXa stammen und auch eine entsprechende FXa-Konformation aufweisen. Sowohl in FXa als auch in XY190 ist die S2-Tasche durch das Tyr99 eingeengt. Daher werden Glycine als P2-Rest von diesen Enzymen stark bevorzugt.

S3 wiederum ist eine stark konservierte Bindestelle. Sie wird in XY190 nominell von Trypsin-Resten begrenzt (Reste 191-192, 215-220), jedoch sind Sequenz und Konformation dieses Bereichs bei Trypsin, FXa und XY190 identisch.

Interessant ist die Situation in der **S4-Tasche**. Diese Tasche ist selber eine Chimäre. Sie wird auf der dem aktiven Zentrum zugewandten Seite von FXa-Resten begrenzt (99-Loop), auf der

gegenüberliegenden Seite von Loop 170, der in XY190 von Trypsin stammt (Abbildung IV-27).

In Faktor Xa ist diese sogenannte Aryl-Bindetasche relativ eng und hydrophob, sie wird von den Resten Tyr99 und Phe174 ausgekleidet. In Trypsin ist diese Tasche offener und weniger hydrophob. An die Stelle des Tyr99 tritt ein Leucin, und der 170-Loop verläuft aufgrund des Pro173 deutlich anders: die Position von Phe174 wird durch Lys175 eingenommen und insgesamt ist die Bindestelle größer und besser zugänglich.

In XY190 bleibt der hydrophobe Charakter der Tasche weitgehend bewahrt, da das Lys175 die Tasche mit seinem aliphatischen Teil begrenzt. Allerdings ist die Tasche weiter geöffnet, sodass die Spezifität hier weniger restriktiv ist als in FXa.

Die Seitenkette von Glu97 am Boden der S4 Tasche ist in beiden XY-Strukturen solvensexponiert, während sie in den bekannten FXa-Strukturen dem gebundenen Substrat zugewandt ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine substratinduzierte Konformation, welche durch elektrostatische Wechselwirkung mit basischen Gruppen der FXa-Substrate stabilisiert wird und in den XY-Strukturen nicht vorhanden ist, da in beiden Strukturen die S4-Tasche nicht besetzt ist.



Abbildung IV-27: Stereodarstellung der S4-Tasche von XY190. Gezeigt sind die Reste 94-99 und 170-175 von rXY190 (orange/rot) und von FXa (weiß). Die Reste Phe174/Lys175 und Glu 97 sind hervorgehoben. Der Inhibitor ist grün, die Hauptkette des restlichen Proteins dunkelblau dargestellt.

IV.5.4.4 Die Ca^{2+} -Bindeschleife von XY und XY190 hat eine ungewöhnliche Konformation

Die Ca^{2+} -Bindeschleife (Reste 69-79) nimmt in XY190 eine untypische Konformation ein. Sie ist im Vergleich zu den entsprechenden Regionen von Trypsin und Faktor Xa um 120° abgelenkt und zeigt nun in die Richtung, in der in FXa die EGF2-Domäne die katalytische Domäne kontaktiert, statt mit den Resten 151-153 zu interagieren. Die neue Lage der Ca^{2+} -Bindeschleife wird durch eine Reihe von Wechselwirkungen mit Loop 116 (Reste 115-118) und Asp24 in Loop 21-26 stabilisiert. Diese beiden Schleifen befinden sich in der FXa-artigen Subdomäne von XY190 und weichen in XY190 im Vergleich zu FXa etwas zurück (Loop 116: etwa 3\AA , Loop 21-26: etwa 1\AA), da keine EGF2-Domäne vorhanden ist. Dadurch wird Platz geschaffen für die neue Konformation der Ca^{2+} -Bindeschleife.

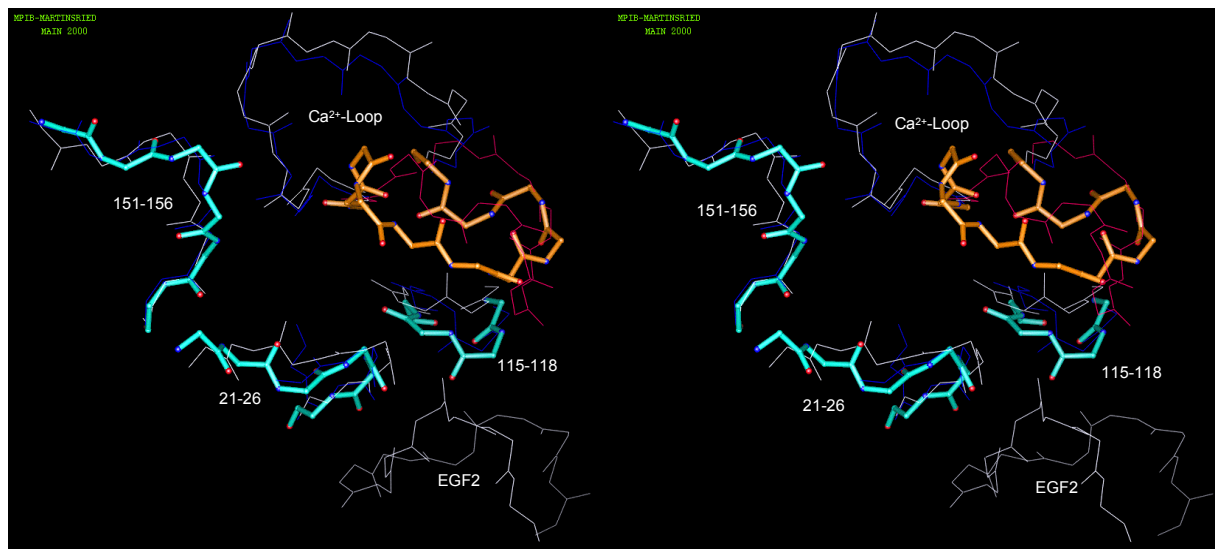


Abbildung IV-28: Stereoansicht der Ca^{2+} -Bindeschleifen und angrenzender Regionen von XY190 (orange/hellblau), XY (rot), FXa (weiß) und Trypsin (dunkelblau). Der Übersichtlichkeit halber sind nur die Hauptketten dargestellt.

Die Ca^{2+} -Bindeschleifen von XY und XY190 haben beide kein Ca^{2+} gebunden und nehmen leicht unterschiedliche Konformationen ein. In XY190 ist die Schleife in engerem Kontakt mit dem restlichen Enzym, in XY etwas stärker solvensexponiert. Diese Unterschiede sind durch die verschiedenen Kristallpackungen bedingt, welche in XY190 nicht exakt die in XY beobachtete Konformation zulassen.

Trotz der unterschiedlichen Kristallpackung sind die Konformationen der Ca^{2+} -Bindeschleife in beiden XY-Strukturen sehr ähnlich. Dies spricht dafür, dass es sich hier nicht um ein kristallographisches Artefakt handelt, sondern die beobachtete Struktur tatsächlich existiert und die Ca^{2+} -Bindeschleife in XY eine neue Konformation einnimmt.

V DISKUSSION

V.1 Untersuchung der Determinanten für die geringe amidolytische Aktivität von FIXa

V.1.1 Der 99-Loop ist für die geringe amidolytische Aktivität von FIXa verantwortlich

V.1.1.1 Tyrosin 99 stabilisiert den 99-Loop

Die Seitenkette von Tyrosin 99 in FIXa nimmt in den beiden bekannten Kristallstrukturen unterschiedliche Konformationen ein.

In einer der Strukturen (1rfn, Hopfner et al., 1999) ist lediglich die S1-Tasche durch PABA besetzt, die anderen Bindestellen sind unbesetzt. Hier hat das Tyr99 eine energetisch günstige Konformation, die allerdings die kanonische Bindung eines peptidischen Substrats durch Blockierung der S2-Bindestelle behindert. In der anderen Struktur ist die Seitenkette von Tyr99 um etwa 60° aus der S2- in Richtung der S4-Tasche gedreht, da die S2-Tasche durch den Prolin-P2-Rest des kovalent gebundenen PPACK-Inhibitors besetzt wird. Diese Konformation der Seitenkette ist energetisch ungünstig, günstiger wäre eine Rotation um 120°. Dies ist aber wiederum nicht möglich, da die Tyrosinseitenkette dann mit derjenigen von Met180 kollidieren würde.

Die Kristallstrukturdaten von FIXa deuten somit darauf hin, dass die Seitenkette von Tyr99 für die geringe amidolytische Aktivität von FIXa verantwortlich ist, da sie in der entspannten Konformation die Substratbindung behindert und vom Substrat erst in eine energetisch unvorteilhafte Position gebracht werden muss.

Durch Austausch der sperrigen Seitenkette von Tyr99 gegen eine kleinere sollten einige dieser unvorteilhaften Eigenschaften wegfallen. Eine kleinere Seitenkette würde die Substratbindung nicht mehr behindern, das Substrat müsste die Seitenkette nicht verdrängen, und falls doch, so sollte es keinen sterischen Konflikt mit Met180 mehr geben.

Punktmutationen an Position 99 hatten jedoch einen zur Erwartung gegenteiligen Effekt auf die amidolytische Aktivität von rF9a. Je kleiner die eingebaute Seitenkette war, um so geringer wurde auch die Aktivität des Enzyms. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der bisherigen Annahme, dass die Präsenz der großen Tyrosinseitenkette für die schlechten amidolytischen Eigenschaften von FIXa verantwortlich ist (Brandstetter et al., 1995, Hopfner et al., 1999).

Aufgrund der geringen amidolytischen Aktivität der Enzyme war es nicht möglich, die kinetischen Parameter k_{cat} und K_{m} getrennt zu bestimmen. Es ist daher nicht bekannt, ob die Substrate in den Mutanten aufgrund einer schlechteren Bindung (erhöhter K_{m}), aufgrund einer schlechteren Orientierung im katalytischen Zentrum (erniedrigter k_{cat}), aufgrund einer bevorzugten Stabilisierung des Grund- statt des Übergangszustandes (erniedrigter k_{cat}) oder durch Kombination all dieser Möglichkeiten schlechter hydrolysiert werden als im Wildtyp.

Auffällig ist die starke Zunahme des K_{i} für PABA in den Mutanten. Wenn die Mutation in Position 99 wie vorhergesagt nur die S2-S4-Bindestellen beeinflusst, so sollte dies keine Auswirkung auf die Bindung von PABA in S1 haben. K_{i} ist in den Mutanten jedoch erhöht. Dies spricht dafür, dass die Verkürzung der Seitenkette von Tyr99 weiterreichende Folgen für

die Konformation des aktiven Zentrums hat, die auch die S1-Bindetasche betreffen. Dabei wird entweder die S1-Tasche direkt destabilisiert oder aber der Zugang zu ihr behindert.

Die Bedeutung von Tyr99 für die amidolytische Aktivität von FIXa ist offenbar komplexer als bisher angenommen. Einerseits behindert die Tyrosinseitenkette klar die kanonische Bindung des Substrats in das aktive Zentrum, andererseits scheint sie aber auch sehr wichtig für die Stabilisierung der gesamten Region zu sein, da in ihrer Abwesenheit die Reaktivität des Enzyms abnimmt und die S1-Tasche offenbar beeinträchtigt ist.

V.1.1.2 Ladung und Länge von Lysin 98 behindern die Substratbindung in S1

Die Seitenkette von Lysin 98 könnte aufgrund ihrer Länge und Ladung ebenfalls mit der Substratbindung in rF9a interferieren. In der Kristallstruktur von PPACK-inhibiertem FIXa ist der δ -Stickstoff von Lys98 lediglich 5 Å vom P2-Prolin des PPACK entfernt. Diese Nähe könnte einerseits zu einer sterischen Behinderung der Substratbindung führen, andererseits kann die positive Ladung des Lysin in der Nähe des Eingangs zur S1-Tasche auch eine abstoßende Wirkung auf die basischen P1-Reste des Substrats haben und dadurch die Substratbindung erschweren.

Der Einfluss von Ladung und Länge der Seitenkette von Lys98 auf die Aktivität von FIXa wurde über eine Reihe von Punktmutanten untersucht.

In der Mutante K98R war keine nennenswerte Veränderung der Aktivität, aber eine leichte Verschiebung der Spezifität zugunsten derjenigen von rF10a festzustellen. Außerdem war K_i leicht erhöht.

K98M hatte verbesserte amidolytische Eigenschaften mit beiden Substraten und die Spezifität war noch rF10a-ähnlicher. Einen dramatischen Effekt hatte die Mutation K98T. Die Reaktivität der Mutante war stark erhöht, und die Selektivität für die beiden untersuchten Substrate entsprach nun fast derjenigen von rF10a. Bei den beiden letztgenannten Mutanten war K_i etwa halbiert. Je kürzer die eingebaute Seitenkette also wurde, um so größer war die Aktivitätssteigerung, um so rF10a-ähnlicher wurde die Spezifität der rF9a-Mutanten und um so kleiner wurde K_i .

Diese Daten sprechen dafür, dass sowohl die Länge als auch die Ladung von Lys98 eine Rolle in der Substraterkennung und Substratbindung spielen. Die Entfernung der positiven Ladung durch Einbau eines Methionin hatte eine deutliche Aktivitätssteigerung zur Folge, auch wenn die sterische Beeinträchtigung durch die Seitenkette noch erhalten blieb. Beim Einbau eines Threonin wurden sowohl die Ladung als auch ein großer Teil der Seitenkette entfernt, und die Aktivitätssteigerung fiel dementsprechend stärker aus.

Der postulierte negative Einfluss von sowohl Ladung als auch Größe von Lys98 auf die Aktivität von FIXa wird durch die Untersuchung dieser Mutanten bestätigt.

Eine genauere Betrachtung der Struktur des 99-Loops und der benachbarten Regionen in FIXa und FXa führte zu der Annahme, dass die beobachtete Aktivitätssteigerung insbesondere in der Mutante K98T nicht lediglich auf die Verkürzung der Seitenkette und Entfernung der Ladung von Lys98 in einem ansonsten starren Loop zurückzuführen ist. Die Veränderung dieser Seitenkette könnte eine weiterreichende Umlagerung des 99-Loops ermöglichen, die in einer FXa-ähnlichen Konformation des Loops und der Seitenkette von Tyr99 resultiert. Die Untersuchung von Mehrfachmutanten, die diese Umlagerung theoretisch weiter begünstigen sollten, bestätigte diese Hypothese: Die Aktivität und Selektivität der Dreifachmutante rF9a K98T Y94F Y177T war mit derjenigen von rF10a vergleichbar.

V.1.1.3 Die Länge des 99-Loops in FIXa ist nicht entscheidend für die Aktivität

Die Verkürzung des 99-Loops um die Alanine 95a/95b hatte keine gravierenden Auswirkungen auf Reaktivität und Selektivität des Enzyms. Die beiden Alanine befinden sich in dem der Substratbinderegion abgewandten Teil des Loops. Ihre Deletion beeinflusst vermutlich die Konformation der Reste 98 und 99 nur geringfügig, da die Lücke von den ebenfalls solventsexponierten Resten Asn95, Ile96 und Asn97 aufgefüllt werden kann. Damit bleibt die Konformation in dem der Substratbinderegion zugewandten Teil des 99-Loops weitgehend unbeeinflusst und blockiert weiterhin den Zugang des Substrats in die S2-S4-Binderegion.

V.1.1.4 Der 99-Loop wird im Komplex mit FVIIIa und FX umorientiert und ermöglicht dann die Substratbindung

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten für verschiedene Punktmutanten im 99-Loop erlauben konkretere Aussagen über die Bedeutung einzelner Elemente des Loops für die Aktivität von FIXa.

Tyr99 hat offenbar anders als bisher angenommen nicht nur einen störenden Einfluss auf die Substratbindung, sondern ihm kommt eine wichtige Funktion in der Stabilisierung des gesamten Loops zu. Die Seitenkette von Tyr99 bildet den „tiefsten“ Punkt des Loops und stützt ihn über der S2-S4-Binderegion ab. Wird diese Seitenkette entfernt, so kann der gesamte Loop nachsacken. Dadurch wird der Zugang für das Substrat in die S2-S4-Binderegion noch stärker versperrt als dies sonst durch die Seitenkette von Tyr99 der Fall ist. Darüber hinaus wird durch eine solche Abwärtsbewegung des Loops die positiv geladene Seitenkette von Lys98 näher an den Eingang der S1-Tasche gebracht, was die Bindung basischer Substratseitenketten in S1 weiter erschwert. Diese Auswirkung auf den Zugang zur S1-Tasche spiegelt sich in der Verschlechterung der K_i für PABA mit den entsprechenden Mutanten wieder. Neben dieser möglichen Behinderung der Substratbindung über eine verstärkte Blockade der Substratbindungsregion durch einen kollabierten 99-Loop kann auch eine erhöhte Flexibilität des Loops die Bindung des Substrats erschweren. Wenn der Loop nicht mehr durch Tyr99 an seinem Boden stabilisiert wird, könnte er verschiedene Konformationen einnehmen, und diese erhöhte Flexibilität wird sich ebenfalls in verschlechterten Bindeeigenschaften niederschlagen.

Lys98 hat verschiedene Auswirkungen auf die Aktivität: Die Substratbindung wird einerseits durch die Länge der Seitenkette erschwert, andererseits durch die Ladung. Die Aktivitätsverbesserung bei Wegnahme der Ladung, zum Beispiel in der Mutante K98M, beruht vermutlich auf einer Verbesserung des elektrostatischen Umfelds für die Bindung des Substrats bei einer unveränderten Konformation des 99-Loops.

Komplizierter wird die Situation für K98T und die sehr aktive Dreifachmutante rF9a K98T Y94F Y177T. In diesen Mutanten überlagern sich vermutlich verschiedene Effekte. In K98T ist der Zugang zur Substratbindungsregion weder durch die Ladung noch durch die Länge der Seitenkette versperrt. Zusätzlich ist der Loop vermutlich in der Lage, eine andere, FXa-ähnliche Konformation einzunehmen, da der sterische Konflikt zwischen den Seitenketten 98 und 177 entschärft ist. Die Dreifachmutante, in der die Situation in FXa weiter nachempfunden ist, bestätigt diese Hypothese aufgrund der starken Aktivitätszunahme. Die neue Konformation ist derjenigen in FXa vermutlich recht ähnlich und gibt den Zugang zur Substratbindungsregion weiter frei als dies in FIXa der Fall ist. Trotzdem kann die Konformation des Loops nicht genau vorhergesagt werden, da der Loop eine Insertion von 2 Resten im Vergleich zu FXa hat. Die Chimäre rF9a 99Loop (F10) Y94F Y177T hat nicht so eine große Aktivität wie die Dreifachmutante. Auch dies spricht dafür, dass die neue Konformation des 99-Loops in den

Mutanten zwar ähnlich wie in FXa ist, aber doch einige durch die Insertion bedingte FIXa-spezifische Abweichungen aufweist.

Die Konformation des 99-Loops in freiem FIXa ist offenbar entscheidend für die geringe amidolytische Aktivität des Enzyms und ist in erster Linie auf die sterischen Konflikte der Seitenketten Lys98 und Tyr177 sowie die stabilisierende Wirkung von Tyr94 und Tyr99 zurückzuführen.

Es ist denkbar, dass die neue Konformation des 99-Loops in rF9a K98T und rF9a K98T Y94F Y177T der Konformation entspricht, die dieser Loop im Komplex mit FVIIIa und dem Substrat FX einnimmt. Bereits an anderer Stelle (Hopfner et al., 1999) war spekuliert worden, dass die Bindung des Kofaktors FVIIIa oder des makromolekularen Substrats FXa die Konformation des 99-Loops beeinflusst und die Bindung des Substrats in das aktive Zentrum so erst ermöglicht wird. Die makromolekularen Substrate von FIXa haben an P2 kein Glycin wie die Substrate von FXa, wo Tyr99 die Bindung größerer Substrate in S2 verhindert, sondern ein Threonin (humaner und avider FXa) bzw. ein Valin (boviner FXa). Dies deutet darauf hin, dass anders als in den homologen Enzymen FXa und APC in FIXa nicht lediglich die Seitenkette von Rest 99 für die Substratspezifität verantwortlich ist, sondern dass dem ganzen 99-Loop eine wichtige Rolle in der Substraterkennung zukommt und erst seine Umorganisation die effiziente Umsetzung des Substrats zulässt.

Analog zur dramatischen Steigerung der amidolytischen Aktivität der Tripelmutante rF9a K98T Y94F Y177T wird also vermutlich auch im Komplex von FIXa mit FVIIIa und FX eine Umlagerung des 99-Loops induziert.

Die postulierte Umlagerung des 99-Loops wird freilich nicht durch FVIIIa alleine bewirkt, da der binäre Komplex FIXa-FVIIIa keine erhöhte amidolytische Aktivität aufweist. Vielmehr wird die Umlagerung erst durch die FX-Bindung vervollständigt. Beide Stufen der FIXa-Aktivierung sind in den vorliegenden Mutanten subsumiert. Aufgrund der Häufung hämophiler Mutanten und der Analogie zum FVIIa-TF-Komplex (Giannelli et al., 1998, Banner et al., 1996) stellt die intermediäre Helix (165-171) des FIXa eine wahrscheinliche Kofaktorbindestelle dar. Die Tripelmutante rF9a K98T Y94F Y177T zeigt ein attraktives Modell einer Zwei-Schritt-Aktivierung des Xase-FX-Komplexes auf: Der Kofaktor FVIIIa bewirkt durch seine Bindung an die intermediäre Helix eine Umlagerung des 177-Loop Bereichs, wohingegen die makromolekulare FX-Substraterkennung die Umlagerungen in den dem aktiven Zentrum benachbarten Schleifen (99-Loop einschließlich K98 und Y94) induziert.

Beide Schritte könnten durch Untersuchung der entsprechenden Einzelmutationen genauer charakterisiert werden. Eine Mutante in Rest 177 sollte eine unveränderte amidolytische Aktivität aber eine erhöhte Aktivität mit FX haben und nicht mehr durch den Kofaktor stimulierbar sein. Mutanten in den Resten 98 und 94 hingegen sollten eine erhöhte amidolytische Aktivität haben und noch durch den Kofaktor stimulierbar sein. Diese Experimente müssten allerdings in Volllänge-Enzymen durchgeführt werden, da im vorliegenden System mit den verkürzten Varianten der Enzyme keine Bindung von FVIIIa und FX an rF9a zu erwarten ist.

Im Fall der Chimären mit dem 99-Loop von F10 ist zwar offenbar auch eine Umorientierung möglich, die den Substratzugang zur S2-S4-Binderegion erleichtert, doch kann der im Vergleich zu FIXa verkürzte und in der Sequenz veränderte Loop vermutlich nicht die optimale Konformation einnehmen. Es ist auch denkbar, dass durch die Verkürzung des Loops ein Zug auf angrenzende Bereiche ausgeübt wird und so zwar der Zugang zu S2-S4 verbessert wird, gleichzeitig aber z. B. der 60-Loop mit dem His57 negativ beeinflusst wird, was die positiven Effekte der Umlagerung zum Teil kompensieren könnte.

Kolkman et al. (2000) beschrieben zwei FIXa-Varianten mit einem um Asn97 und Lys98 verkürzten 99-Loop bzw. der Mutation K98A. Beide Mutanten hatten eine gesteigerte Aktivität gegenüber synthetischen Substraten und FX, die sich aus einer Abnahme von K_m und einer Zunahme von k_{cat} zusammensetzte. In Gegenwart von FVIIIa war die Aktivität gegenüber FX nicht erhöht sondern entsprach der Wildtypaktivität. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit der hier formulierten These, dass durch die Bildung des Komplexes aus FVIIIa und FIX die Voraussetzungen für eine Konformationsänderung des 99-Loop geschaffen werden, welche im freien Enzym durch sterische Behinderung der Reste 98 und 177 nicht möglich ist, in den besprochenen Mutanten durch Verkürzung von Lys98 hingegen spontan eintreten kann. Die Tatsache, dass die Verkürzung des 99-Loops in vorliegender Arbeit keine Aktivitätsänderung zur Folge hatte, bei Kolkman et al. jedoch zu einer Aktivitätssteigerung führte, stellt keinen Widerspruch dar, da die Art der Verkürzung sich stark unterschied. In vorliegender Arbeit wurden solvens exponierte Reste ohne große Seitenkette deletiert, und die Flexibilität des Loops in diesem Bereich war groß genug, um die Lücke zu schließen. Bei Kolkman et al. hingegen waren zwei Reste mit großen Seitenketten entfernt worden, und an Stelle des Lys98 trat in der Mutante ein Ile, welches nicht ganz so stark mit Tyr177 kollidieren sollte und daher eine günstigere Konformation des Loops zulässt.

FIXa ist als ein Enzym mit einer strikt regulierten Aktivität evolviert. In Abwesenheit von Kofaktor und dem physiologischen Substrat hat FIXa quasi keine Aktivität, was zu einem großen Teil auf die Konformation des 99-Loops zurückzuführen ist. Die Seitenketten von Tyr99 und Lys98 behindern die Substratbindung und werden erst nach Bindung von Substrat und Kofaktor durch eine größere Umorganisation des Loops wegbewegt. Diese „geschlossene Konformation“ wird durch mehrere Sicherheitsmechanismen gewährleistet. Lys98, Tyr94 und Tyr177 verhindern eine spontane Umlagerung der Schleife. Tyr99 blockiert die kanonische Substratbindung, stabilisiert aber gleichzeitig den gesamten Loop, sodass eine Punktmutation an dieser Stelle in einem noch inaktiveren Enzym resultiert, statt die Substratbindungsregion zu öffnen.

An dieser mehrfachen Kontrolle der Aktivität von FIXa über die Bindung von Kofaktor und Substrat, ganz abgesehen von den bereits in der Einleitung erwähnten Mechanismen wie Membran- und Ca^{2+} -Abhängigkeit der Aktivität, wird die zentrale Bedeutung von FIXa als wichtigstem FX-Aktivator im Verlauf der Gerinnung und als Schnittstelle zwischen extrinsischem und intrinsischem Weg sowie zwischen Initiation und Amplifikation der Gerinnung deutlich. Die Dysfunktion dieses Enzyms kann verheerende Folgen haben, weshalb seine Aktivität ganz besonders strikt reguliert werden muss.

V.1.2 Die S1-Tasche von FIXa wird durch Glu219 stabilisiert

Das Glutamat 219 nimmt in FIXa eine energetisch ungünstige Konformation ein, wird jedoch durch mehrere Wechselwirkungen stabilisiert. Durch die Mutation E219G war die Aktivität von rF9a stark erniedrigt worden (Hopfner, 1997), weil vermutlich hier die stabilisierenden Wechselwirkungen, unter anderem die Salzbrücke zwischen N δ von Lys224 und der Carboxylgruppe von Glu219, nicht mehr aufrechterhalten wurden und damit die Konformation der S1-Tasche gestört wurde. Durch die Mutation E219Q sollte die Bedeutung dieser Salzbrücke für die Integrität der S1-Tasche differenzierter überprüft werden. Die Seitenkette von Glutamin ist gleichgroß wie die von Glutamat, ist allerdings ungeladen. Es kann zu Lys224 keine Salzbrücke, sondern nur noch eine Wasserstoffbrücke ausgebildet werden. Diese schwächere Interaktion sollte auch eine schwächere Stabilisierung der Konformation von Rest 219 und damit eine leichte Destabilisierung der S1-Tasche zur Folge haben. Die Mutante hatte leicht verschlechterte katalytische Eigenschaften und eine leicht erhöhte Bindungskonstante für PABA, was diese These bestätigte.

Der Rest 219 nimmt somit in FIXa eine Sonderstellung ein. Anders als in verwandten Enzymen ist er ein Glutamat, mit einer energetisch ungünstigen Hauptkettenkonformation. Trotzdem ist genau dieser Rest für die Aktivität und Stabilität der S1-Tasche notwendig. Die Entfernung seiner Seitenkette oder auch nur die Abschwächung der Interaktionen der Seitenkette mit der Umgebung dieses Restes resultieren in einer Aktivitätsverminderung des Enzyms.

V.2 Herstellung und Kristallisation von rF7a

V.2.1 Renaturierung

Die Herstellung von rF7a aus *E. coli* inclusion bodies nach dem „Standardverfahren“ war nicht möglich. Die Pufferzusammensetzung musste abgewandelt und die Bedingungen optimiert werden. Im Verlauf der Suche nach Renaturierungsbedingungen wurde eine Reihe von Chimären und Konstrukten verschiedener Länge hergestellt und getestet.

Die Chimären zeigten, dass die schlechten Renaturierungseigenschaften von rF7a vermutlich auf spezielle Eigenschaften der katalytischen Domäne zurückzuführen sind. Die Renaturierung ist offenbar nicht von der EGF2-Domäne getrieben, da Austausch der EGF2 von FVIIa gegen diejenigen von FIXa bzw. FXa keine verbesserte Renaturierung zur Folge hatte. Die verhältnismäßig kleine EGF2-Domäne ist also vermutlich nicht in der Lage, unabhängig zu falten und durch Präsentation der hydrophoben Domänenkontakfläche die Faltung der sehr viel größeren katalytischen Domäne zu begünstigen.

Die Sonderstellung von rF7a im Vergleich zu anderen erfolgreich rückgefalteten Gerinnungsenzymen wird auch dadurch deutlich, dass die gefundene Renaturierungsbedingung, nämlich insbesondere Anwesenheit großer Konzentrationen an Ethylenglycol, einen negativen Einfluss auf die Renaturierungsausbeute anderer Enzyme hat. Ethylenglycol scheint demnach für die Stabilisierung spezieller Zwischenprodukte, die nur bei der Faltung von rF7a auftreten, eine wichtige Rolle zu spielen. Ob diese Stabilisierung auf einer spezifischen Interaktion von Ethylenglycol und rF7 oder eher auf allgemeinen Eigenschaften des Ethylenglycol wie der Erniedrigung der Dielektrizitätskonstante des Puffers beruht, ist nicht klar.

V.2.2 Röntgenstrukturanalyse von rF7a^{BA} und rF7a

Die Kristallstruktur von rF7a im Komplex mit Benzamidin (rF7a^{BA}) zeigte keine wesentlichen Abweichungen zu den bereits bekannten Strukturen von kovalent inhibiertem FVIIa. Es ist offenbar, zumindest in der vorliegenden Kristallform, ausreichend für die korrekte Ausbildung des aktiven Zentrums und die Stabilisierung der Aktivierungsdomäne, wenn die S1-Tasche des Enzyms durch einen kleinen nichtkovalent gebundenen Inhibitor wie Benzamidin besetzt ist. Weder eine kovalente Inhibition noch ein großer Inhibitor oder die Bindung des Kofaktors TF sind demnach notwendig, um im aktivierten Enzym die aktive Konformation zu induzieren.

Im Gegensatz dazu war in der Struktur von rF7a, in der das Benzamidin nachträglich aus dem Kristall herausgewaschen worden war, eine Destabilisierung der Aktivierungsdomäne und der S1-Tasche zu beobachten. Diese Destabilisierung umfasst den „linken“ Teil der Aktivierungsdomäne: die Regionen 215-224 sowie 184-192 sind im Gegensatz zu rF7a^{BA} etwas verschoben und flexibler, der 170-Loop ist vollkommen ungeordnet und die intermediäre Helix ist leicht verschoben. In Abwesenheit von Inhibitor bzw. Substrat und Kofaktor ist demnach die S1-Tasche deformiert, was die Substratbindung erschwert und die schlechte Reaktivität des freien FVIIa erklärt.

Der N-Terminus ist in rF7a korrekt inseriert, die Oxyaniontasche ist richtig ausgebildet und die Reste der katalytischen Triade nehmen ihre normale Position ein. Dennoch ist vermutlich auch dieser Bereich von der Destabilisierung der leeren S1-Tasche betroffen. Der N-Terminus befindet sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen der inserierten, geordneten und

der nicht insertierten, ungeordneten Konformation. Im freien Enzym ist der N-Terminus weniger oft insertiert. Wenn er insertiert ist, kann er nur eine einzige Konformation einnehmen, wenn er nicht insertiert ist, ist der N-Terminus sehr flexibel. Aus diesem Grund ist auch in rF7a die „richtige“ Konformation des N-Terminus zu beobachten, da alle anderen Möglichkeiten zu variabel sind, als dass sie in der Elektronendichte sichtbar werden würden.

Eine Reihe von Untersuchungen sprechen dafür, dass der Übergang von FVIIa von der inaktiven in die aktive Konformation nach der Bindung von makromolekularem Substrat und Kofaktor über mehrere diskrete allosterische Umlagerungen erfolgt. Das freie aktivierte Enzym liegt in einem Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation vor, welches durch Bindung der makromolekularen Interaktionspartner zugunsten der aktiven Konformation verschoben wird.

Eine dieser Umlagerungen betrifft die Insertion des N-Terminus zur Ausbildung der Salzbrücke zwischen Ile16 und Asp194, wodurch die Anordnung der katalytischen Triade fixiert wird. Wie erwähnt befindet sich der N-Terminus in einem dynamischen Gleichgewicht und ist im freien Enzym weniger oft insertiert, also leichter zugänglich. Die Lage des Gleichgewichts wird durch die Kofaktor- oder Substratbindung verschoben, doch kommt es nie zu einer 100%-igen Fixierung des N-Terminus im Enzym. Dies lässt sich dadurch nachweisen, dass sowohl freier als auch komplexierter FVIIa durch Carbamylierung des N-Terminus inaktiviert werden kann. Die Inaktivierung ist stärker für das freie Enzym. Higashi et al. (1996) ermittelten über die Carbamylierungsrate, dass über eine gegebene Zeitspanne bei freiem FVIIa durchschnittlich nur 0,75% des Enzyms ständig in der aktiven Form mit inseriertem N-Terminus vorliegen, während im Komplex FVIIa-rsBTF der entsprechende Anteil 81% beträgt. Diese 110-fache Steigerung der theoretischen Konzentration an aktivem Enzym stimmt auch mit der je nach Substrat 40-150-fachen Aktivitätssteigerung für peptidische Substrate überein. Eine andere Region, die für die vollständige Aktivierung wichtig ist, betrifft den Bereich zwischen der intermediären Helix (Reste 165-170), dem 170-Loop (168-182) und der S1-Tasche. Der 170-Loop ist in FVIIa um fünf Reste länger als in verwandten Enzymen und bildet den äußeren Rand der Arylbindetasche. Der N-terminale Teil der Helix bildet einen Teil der Kontaktfläche zwischen der katalytischen Domäne und Tissue Faktor. Zahlreiche natürlich vorkommende und experimentell hergestellte Mutanten (Petrovan et al., 2000) in diesem Bereich sprechen dafür, dass diese Region eine wichtige Rolle für die allosterische Aktivierung von FVIIa nach TF-Bindung hat. Störungen der Interaktionsstellen der intermediären Helix bzw. des 170-Loops mit der Aktivierungsdomäne resultierten in einer verminderten Aktivierbarkeit von FVIIa durch TF. Darüber hinaus konnten Petrovan et al. (2000) zeigen, dass in Mutanten, in denen die Insertion des N-Terminus behindert war, die Aktivitätssteigerung durch TF-Bindung normal blieb, wenngleich die Gesamtaktivität der Mutanten aufgrund der nicht optimalen Ausrichtung der katalytischen Triade hinter der Aktivität des Wildtypenzym zurückblieb. Die beiden Bereiche haben somit eine unterschiedliche Bedeutung für den Übergang von FVIIa von der inaktiven in die aktive Konformation.

Der Vergleich der beiden rF7a-Strukturen mit besetzter und freier S1-Tasche bestärkt die Ergebnisse der Mutagenese-Studien, nach denen ein enger Zusammenhang zwischen der TF-Bindung im Bereich der intermediären Helix, der Konformation des 170-Loops und der Stabilität der S1-Tasche besteht. In rF7a^{BA} war diese Region „von innen heraus“ geordnet worden, da die S1-Tasche durch die Bindung des Inhibitors in der aktiven Konformation stabilisiert war. Die intermediäre Helix war zusätzlich durch ein gebundenes Sulfat stabilisiert. Diese Ordnung von innen (S1) nach außen (intermediäre Helix und 170-Loop) kann umgekehrt durch Bindung von TF auch von außen nach innen induziert werden. Fehlen die stabilisierenden Einflüsse sowohl außen als auch innen, wie in rF7a, so ist die gesamte Region ungeordnet.

Die Beobachtung, dass die Stabilität der TF-Binderegion und der S1-Tasche offenbar in engem Zusammenhang miteinander stehen, erklärt auch, warum in FVIIa im Gegensatz zu FIXa und FXa die amidolytische Aktivität durch Bindung des Kofaktors gesteigert werden kann. Die Bindung von TF präsentiert nicht nur erweiterte Bindestellen für das makromolekulare Substrat FX, um FVIIa und FX optimal zueinander zu positionieren, sondern wirkt sich auch direkt positiv auf die Konformation des aktiven Zentrums aus. In einer stabileren S1-Tasche ist dann auch die Bindung und folglich Umsetzung peptidischer Substrate gegenüber dem freien Enzym bevorzugt.

V.3 Ethylenglycol stimuliert die Aktivität von FIXa durch Wechselwirkung mit dem 99-Loop und bindet in FVIIa in der Nähe des 60-Loops

Glycerin und Ethylenglycol stimulieren die Aktivität von FVIIa und FIXa. Es wird vermutet, dass der stimulatorische Effekt der beiden Alkohole darin besteht, dass eine Konformationsänderung im 99-Loop hin zur aktiven Konformation begünstigt wird (Stürzebecher et al., 1997). Dafür spricht die Beobachtung, dass FIXa-Mutanten im 99-Loop, die eine höhere Aktivität aufweisen als FIXa, weniger stark durch die Zugabe von FVIIIa oder Ethylenglycol stimuliert werden können. Die resultierende Aktivität entspricht dann der Aktivität, die durch Stimulation des Wildtyps erreicht werden kann (Kolkman et al., 2000). Auch die Ergebnisse mit rF9a-Mutanten aus vorliegender Arbeit deuten darauf hin, dass die Wirkung von Ethylenglycol und Glycerin auf einer Beeinflussung des 99-Loop beruht. Je ähnlicher der 99-Loop in den rF9a-Mutanten dem entsprechenden Loop von rF10a wurde, um so geringer war die Stimulierbarkeit der Aktivität durch Zusatz von Ethylenglycol. Umgekehrt war die Chimäre rF10a 99-Loop (F9) durch Ethylenglycol stimulierbar. Die Inhibition durch den Alkohol, welche bei rF10a sofort einsetzt, wurde in der Chimäre je nach Substrat erst bei 27% bzw. 37% sichtbar.

In rF7a wurde aus verschiedenen Gründen die Aufmerksamkeit auf Ethylenglycol gelenkt. Einerseits war die Renaturierung von rF7a nur in Gegenwart von Ethylenglycol möglich. Ob Ethylenglycol durch spezifische oder allgemeine Wechselwirkungen mit dem Protein die Faltung begünstigt ist nicht bekannt.

Die Aktivität von rF7a war durch Ethylenglycol im gleichen Ausmaß stimulierbar wie die Aktivität des nativen humanen Enzyms. Auch Glycerin stimulierte die Aktivität des Enzyms, wenn auch nicht so stark wie Ethylenglycol.

In der 1,69 Å Kristallstruktur von rF7a^{BA} konnte in einer Tasche zwischen dem 60- und dem 90-Loop ein Glycerinmolekül in die Elektronendichte eingebaut werden. In der 2,44 Å Struktur von rF7a war an dieser Position ein Ethylenglycolmolekül gebunden.

Ein Vergleich dieser Bindestelle mit den entsprechenden Regionen in FIXa und FXa zeigte, dass die beobachtete Bindung in FIXa ebenfalls möglich wäre. In FXa hingegen ist die Bindestelle durch die Seitenketten von Lys90 und Tyr60 blockiert, eine Bindung der Alkohole an der äquivalenten Position ist nicht möglich.

Die Kristallstruktur von rF7a lässt nicht erkennen, ob oder wie die Bindung der Alkohole an dieser Position einen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms ausüben kann. Die Stabilisierung der Bindung erfolgt über Reste des 60-Loops. Der 60-Loop begrenzt die S1'-Bindestelle in den trypsinartigen Serinproteasen. Diese Bindestelle wird bei der Hydrolyse synthetischer Substrate nicht mit ausgenutzt. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Aktivitätssteigerung

für synthetische Substrate in Gegenwart der Alkohole auf einer Veränderung des 60-Loops beruht. Allerdings befindet sich auch das katalytische His57 in dieser Region, und eine mögliche Wechselwirkung mit dem 60-Loop könnte die Ausrichtung der Reste der katalytischen Triade beeinflussen. Gegen diesen Wirkungsmechanismus sprechen die oben zitierten Ergebnisse, die darauf hindeuten, dass die Aktivitätssteigerung durch die Alkohole über den 99-Loop vermittelt wird. Für eine Interaktion mit dem 99-Loop ist die Bindestelle allerdings zu weit entfernt. Um zu klären, ob die gefundene Bindestelle von funktioneller Relevanz ist, könnten die Seitenketten von Lys90 und Tyr60 in FXa durch Mutagenese verkürzt werden. Wenn durch diese Mutationen eine Stimulierbarkeit in FXa eingebracht werden kann, dann handelt es sich hier um die Bindestelle, über die die Alkohole über einen noch unverstandenen Mechanismus die Aktivität von FIXa, FVIIa und dann auch FXa stimulieren können.

V.4 Verbesserung von rXYa als Modell für FXa

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das P1-Selektivitätsprofil des chimären Enzyms rXYa an dasjenige von Faktor Xa anzugleichen, um den Nutzen von rXYa als Kristallisationsmodell für FXa-Inhibitoren zu steigern.

Dazu wurde überprüft, ob eine Punktmutation in der S1-Tasche des chimären Enzyms rXYa ausreichend ist, die Selektivität von rXYa zugunsten von P1-Arginin-Substraten zu erhöhen. Durch den Austausch von Ser190 gegen ein Alanin konnte die Selektivität von rXYa für Arginin- vs Lysin- P1-Reste um das Achtfache gesteigert werden und ähnelt nun mehr der P1-Spezifität von FXa als derjenigen von Trypsin. Die Bindeeigenschaften gegenüber den P2 - P4 Seitenketten blieben von der Mutation unberührt. Dies wurde auch durch die Kristallstruktur des Enzyms verdeutlicht. Die gewählte Mutation ist somit geeignet, die Eigenschaften von rXYa an diejenigen von FXa anzupassen.

Der Effekt dieser Mutation wurde auch in einer Reihe anderer Enzyme untersucht, um ein Bild davon zu erhalten, ob sich diese gezielte Spezifitätsänderung auf die S1-Tasche verwandter Enzyme übertragen läßt.

Darüber hinaus wurde analysiert, wie sich die kinetischen Parameter k_{cat} und K_{m} im Detail durch die Mutation veränderten. Diese Untersuchungen erlaubten Rückschlüsse darauf, welche Vorgänge in der S1-Tasche die veränderte Selektivität bewirkten.

V.4.1 Ein Serin/Alanin-Austausch an Position 190 beeinflusst nur die Spezifität der S1-Tasche und nicht die der S2-S4-Taschen

In den Arbeiten von Evin (1990) und Perona (1993) wurde bereits gezeigt, dass der Rest 190 in der S1 Tasche von Trypsin wichtig für die Bindung von Lysinseitenketten ist, während Argininseitenketten eher über den Rest 189 stabilisiert werden. In diesen Arbeiten blieb jedoch offen, ob der beobachtete Effekt lediglich auf die S1-Tasche beschränkt ist, oder ob eine Mutation an dieser Position auch eine Auswirkung auf andere Bereiche des Enzyms hat, da die Untersuchungen nur mit einem einzigen Substratpaar (GPR-AMC und GPK-AMC) durchgeführt wurden.

Vorliegende Arbeit belegt, dass die Punktmutation an Position 190 tatsächlich lediglich die Eigenschaften der S1-Tasche beeinflusst. Das Selektivitätsprofil für eine Reihe in P1 identischer Substrate blieb zwischen Wildtyp und Mutante bei den Enzymen Trypsin, rXYa und rF10a konstant, obwohl die Mutanten deutlich in ihren amidolytischen Eigenschaften verändert waren. Die Aktivitätsänderungen waren jedoch für alle betrachteten Substrate proportional zueinander.

Die Reaktivität der Enzyme für die verschiedenen Substrate überspannte einen Bereich von 2 Größenordnungen. Da der P1 Rest überall konstant war, ist diese Variabilität auf unterschiedlich gute Bindung der übrigen Substratreste zurückzuführen. Eine Konformationsänderung in den S2 - S4 Bindetaschen, hervorgerufen durch die Punktmutation in Position 190, sollte sich in einem veränderten Verhalten gegenüber verschiedenen Substraten bemerkbar machen. Da dies nicht der Fall war, und außerdem die Kristallstruktur von rXYa S190A keine auffälligen Konformationsänderungen in diesem Bereich zeigte, kann davon ausgegangen werden, dass die betrachtete Mutation lediglich die Eigenschaften der S1 Tasche betrifft.

V.4.2 Serin/Alanin 190 haben einen vergleichbaren Einfluss auf die S1-Selektivität in mehreren verwandten Serinproteasen

Die Bedeutung von Serin und Alanin 190 für die Erkennung und Hydrolyse von Arginin- oder Lysin- P1-Substraten wurde in den Enzymen Trypsin, rXYa, rF10a und rF9a untersucht und miteinander verglichen.

Die betrachteten Enzyme divergierten stark in ihrer Reaktivität und Selektivität für die untersuchten Substrate. Ungeachtet aller Unterschiede war die Selektivitätszunahme zugunsten von Argininsubstraten von der Serin- zur Alanin- Variante stets ähnlich (im Durchschnitt 5,5-fach).

Dieses Ergebnis deutete darauf hin, dass die An- oder Abwesenheit der γ -Hydroxylgruppe des Ser190 für die Selektivität der Bindung von Arginin- und Lysinsubstraten in allen Enzymen gleichbedeutend ist. Während die Lysinseitenkette lediglich über eine Wasserstoffbrücke mit der γ -Hydroxylgruppe des Ser190 stabilisiert wird, kann die Guanidiniumgruppe des Arginin zusätzlich mit der Carboxylgruppe des Asp189 am Boden der S1-Tasche interagieren. Die Ausgangsselektivität der Enzyme hängt neben diesen Interaktionen in der S1-Tasche davon ab, wie gut das Substrat von den anderen Bindetaschen erkannt wird. Je stärker die Bindung dort ist, desto geringer ist der Einfluss der S1-Tasche und desto geringer ist auch die S1-Selektivität.

Da die Selektivitätsänderung nach Mutagenese von Rest 190 unabhängig von der Ausgangssituation immer ähnlich groß war, spricht dies dafür, dass die Bedeutung von Serin/Alanin 190 für die Bindung der P1-Kette in allen Enzymen vergleichbar ist.

Bei den Enzymen Trypsin, rXYa und rF10a konnten die kinetischen Parameter k_{cat} und K_m separat bestimmt werden. Hierbei wurden mehrere Trends deutlich:

V.4.2.1 K_m

Die K_m -Werte waren in allen Mutanten für ein gegebenes Substrat erhöht. Dies läßt darauf schließen, dass unabhängig von der resultierenden Gesamtaktivität des Enzyms der jeweilige Wildtyp eine für die Substratbindung optimierte S1-Tasche besitzt. Die Einführung einer Punktmutation in die S1-Tasche bewirkt möglicherweise minimale, auch in der Kristallstruktur nicht unbedingt sichtbare Konformationsänderungen, die die optimale Bindung des Substrats nicht mehr zulassen.

Darüber hinaus war für jedes Enzym mit einem gegebenen Substratpaar der K_m -Wert des Lysinsubstrats stets höher als der K_m -Wert des Argininsubstrats. Dies ist in Übereinstimmung damit, dass das Argininsubstrat zusätzliche Wechselwirkungen eingehen kann, also stärker gebunden wird und einen niedrigeren K_m -Wert hat als das Lysinsubstrat.

V.4.2.2 k_{cat}

Die Entwicklung der k_{cat} -Werte war von der Kombination von Rest 190 und P1-Substratseitenkette abhängig. Für Lysinsubstrate waren die k_{cat} -Werte in den Ser190-Varianten höher als in den Ala190-Enzymen, für Argininsubstrate waren die k_{cat} -Werte in den Ala190-Varianten höher.

Lysine werden in den Ala190-Enzymen lediglich über hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Vermutlich reichen diese Wechselwirkungen nicht aus, um die zu spaltende Bindung

präzise im aktiven Zentrum zu positionieren, sondern das Substrat behält eine zu hohe Flexibilität und wird daher nicht optimal umgesetzt. Erst die Interaktion mit der γ -Hydroxylgruppe des Ser190 ermöglicht eine bessere Positionierung und damit effektivere Spaltung des Substrats.

Die umgekehrte Situation kann bei Argininseitenketten der Fall sein: Die mehrfachen Interaktionen in der Gegenwart von Ser190 bewirken zwar eine recht feste, aber evtl. auch zu starre Bindung des Substrats, die vielleicht ebenfalls nicht mit der optimalen Positionierung übereinstimmt. Eine Lockerung der Bindung im Ala190-Enzym kann hier die für eine effektive Katalyse erforderliche Flexibilität einführen.

Diese Überlegung wird auch durch die Ausnahme von der Regel bestätigt: bei Trypsin lag der k_{cat} -Wert mit dem Substrat tGPK in der Ala190-Variante leicht über dem des Ser190-Enzyms. Im Ser190-Enzym ist allerdings der K_m -Wert für tGPK extrem niedrig und liegt in der Größenordnung desjenigen für tGPR. Es kann also sein, dass auch in diesem Fall das Substrat für eine optimale Umsetzung „zu gut“ gebunden ist und eine Lockerung der Bindung die Katalyseerate erhöht.

V.4.3 rF9a hat eine besonders hohe Selektivität für Arginin-P1-Reste

rF9a nimmt unter den untersuchten Enzymen eine Sonderstellung ein:

Die Reaktivität des Enzyms liegt um 3-7 Größenordnungen unter derjenigen von rF10a, rXYa und Trypsin. Diese niedrige Reaktivität von rF9a ist durch seine sehr hohen K_m -Werte bedingt. Da die K_m -Werte höher liegen als die Substratlöslichkeit, konnten für rF9a nur die Spezifitätskonstanten k_{cat}/K_m , nicht jedoch die einzelnen Parameter k_{cat} und K_m bestimmt werden.

Gleichzeitig weist das Enzym eine im Vergleich mit den anderen Enzymen um ein Vielfaches erhöhte Selektivität für Argininreste in P1 auf, und zwar sowohl mit Ser190 (WT) als auch mit Ala190.

Darüber hinaus war in der Mutante eine Verdopplung der Reaktivität mit Argininsubstraten zu beobachten.

Die strukturelle Ursache der niedrigen amidolytischen Aktivität von Faktor IXa bzw. rF9a war bereits das Ziel zahlreicher Studien (vgl. z.B. Hopfner, 1997). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde den Grundlagen der Besonderheiten von rF9a nachgegangen (siehe Kapitel IV.1). Insbesondere der 99-Loop behindert in rF9a die Substratbindung in die S2-S4-Taschen und bedingt somit den hohen K_m -Wert des Enzyms.

Die hohe Selektivität für Arginin in P1 ist vermutlich eine direkte Folge der schlechten Substratbindung in die anderen Bindetaschen. Je schlechter das Substrat dort gebunden wird, um so wichtiger wird die Stabilisierung des P1-Restes für Bindung und Katalyse des gesamten Substrats. Der Unterschied in der Bindungsenergie zwischen Arginin- und Lysinseitenketten hat einen sehr viel höheren relativen Anteil an der gesamten Bindungsenergie und fällt daher auch viel stärker ins Gewicht.

Darüber hinaus ist es denkbar, dass neben der beeinträchtigten Substratbindung in S2-S4 auch besondere Eigenschaften der S1-Tasche von rF9a eine Rolle für die vergleichsweise hohe Selektivität für Arginin spielen.

Die S1-Tasche von rF9a unterscheidet sich in der Position 219 durch ein Glutamat von der Situation in verwandten Enzymen, welche normalerweise an dieser Stelle ein Glycin besitzen. Die Konformation der Hauptkette der S1-Tasche ist an dieser Position für alle Reste außer einem Glycin energetisch ungünstig. Die Struktur von rF9a bzw. Faktor IXa mit einer unbesetzten S1-Tasche ist nicht bekannt, doch ist es möglich, dass diese energetisch ungünstige

Konformation die S1-Tasche zumindest teilweise destabilisiert. Durch Bindung einer langen, rigiden Seitenkette, wie die von Arginin, könnte die Konformation der S1-Tasche in einem *induced-fit* Mechanismus stabilisiert werden. Darüber hinaus kann eines der terminalen Stickstoffatome der Argininseitenkette mit dem Carbonylsauerstoff des Glu219, welches in die S1-Tasche ragt, eine Salzbrücke formen (Abstand: 2,8 Å), während dies dem Lysin nicht möglich ist (Abstand: 4,4 Å). Diese Interaktion kann im Falle einer Argininbindung zu einer zusätzlichen Stabilisierung der S1-Tasche führen, was nicht nur positiv für die Bindung, sondern auch für die Positionierung und damit Umsetzung des Substrats sein könnte.

Für eine genaue Analyse der Grundlagen der Aktivitätszunahme für Argininsubstrate in der Ala190 Mutante wäre es nötig, die Veränderung der einzelnen kinetische Parameter zu kennen. Deren Ermittlung war jedoch für rF9a nicht möglich. Es ist somit nicht bekannt, ob bei rF9a wie bei den anderen Enzymen in der Mutante die K_m -Werte verschlechtert sind und die k_{cat} -Werte sich je nach Substrat entwickeln (Zunahme für Arginin, Abnahme für Lysin), oder ob hier andere Mechanismen eine Rolle spielen.

V.4.4 rF9a Ala190 und rF10a Ala190 haben eine erhöhte Reaktivität gegen Argininsubstrate

Die beiden von Gerinnungsenzymen abgeleiteten Varianten rF9a und rF10a stehen sich evolutionär näher als Trypsin. Dies spiegelt sich auch, trotz aller Unterschiede in der absoluten Reaktivität, in der Entwicklung der Aktivität in der Gegenwart von Serin oder Alanin in Position 190 wieder. Bei beiden Enzymen ist die Aktivität für Argininsubstrate in den Enzymen mit Ala190 doppelt so hoch wie in den Ser190-Enzymen, die Aktivität für Lysinsubstrate ist etwa halbiert.

Die natürlichen Substrate beider Enzyme haben stets ein Arginin in P1. Während in Faktor Xa Rest 190 als Alanin konserviert ist, ist er in Faktor IXa immer ein Serin und damit derjenige, für den die Reaktivität mit Argininsubstraten nur halb so groß ist. Auch Rest 190 ist demnach für die geringe Aktivität von Faktor IXa verantwortlich. Zwar spielt dieser Rest für die niedrige Gesamtaktivität des Enzyms eine vergleichsweise geringe Rolle, doch wird auch hier die Evolution von Faktor IXa hin zu einem möglichst wenig reaktiven Enzym am Beginn einer lebenswichtigen Enzymkaskade deutlich.

V.4.5 rXYa S190A hat FXa-, Trypsin- und neue Eigenschaften

Das chimäre Enzym rXYa hat katalytische Eigenschaften, die teils an seine „Eltern“ erinnern, teils neu sind (vgl. Hopfner, 1997). Das Selektivitätsprofil für große P3- und P4-Reste ähnelt demjenigen von Trypsin. Allerdings ist die Schwankungsbreite in der Selektivität bzw. Reaktivität mit verschiedenen Substraten bei Trypsin sehr viel höher als bei rXYa. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass das aktive Zentrum von rXYa von Trypsin- und FXa-Resten gebildet wird und die katalytischen Reste nicht ganz optimal zueinander positioniert sind, somit die maximal erreichbare Umsatzzahl hinter der von Trypsin zurückbleibt.

Die Spezifität in S2 ist in rXYa weniger ausgeprägt als in Trypsin und FXa. Jedoch ist auch hier eine klare Präferenz für kleine P2-Reste erkennbar. In rXYa wird wie in FXa die höchste Reaktivität mit Glycin in P2 erzielt, während Trypsin am besten ein Substrat mit Prolin in P2 hydrolysiert. Prolin hat den Vorteil, dass bereits ein für die Bindung vorteilhafter „Knick“ in der Substrathauptkette vorliegt, während dieser bei allen anderen P2-Resten erst eingeführt werden muß. In FXa und rXYa wirkt dieser vorteilhaften Eigenschaft von Prolin die Tatsache

entgegen, dass der 99-Loop die Bindung von P2-Resten, die größer als Glycin sind, sterisch behindert bzw. die Seitenkette des Tyr99 erst unter Energieaufwand beiseite geschoben werden muß. Aus diesem Grund ist die Hydrolyse von Substraten mit Prolin in P2 gegenüber anderen Substraten in FXa und eingeschränkt auch in rXYa zwar immer noch deutlich bevorzugt, jedoch weniger gut als die Hydrolyse von P2-Glycin-Substraten.

Die Selektivität der S1-Tasche für Arginin- oder Lysinreste wird wesentlich durch Rest 190 mitbestimmt. Durch Einführung des Faktor Xa entsprechenden Restes Ala190 in rXYa konnte die Spezifität der S1-Tasche dieses Enzyms der Spezifität von FXa angeglichen werden.

Die enzymatischen Eigenschaften von rXYa S190A sind trotz der verbesserten S1-Tasche noch deutlich von FXa entfernt. Dies dürfte in erster Linie auf die Hybrid-Natur von S4-Tasche und aktivem Zentrum zurückzuführen sein.

V.4.6 rXYa S190A ist ein geeignetes Kristallisationsmodell für Faktor Xa

Die Kristallstruktur von rXYa S190A unterstreicht in mehrfacher Hinsicht den Nutzen von rXYa als Kristallisationsmodell für FXa.

Im Gegensatz zum häufig für die Kokristallisation von FXa-Inhibitoren verwendeten Trypsin besitzt rXYa wichtige Strukturelemente von FXa entlang der Substratbindungsregion, insbesondere den 99-Loop (S2, S4) und den 60-Loop (S2, S1'). Die hier präsentierte Struktur belegt, dass die Seitenkette von Tyr99 in rXYa eine FXa-ähnliche Konformation einnehmen kann. Inhibitor 34755 läßt die S2-Tasche unbesetzt, daher liegt das Tyr99 in einer relaxierten Konformation vor, welche derjenigen entspricht, die auch in FXa-Kristallstrukturen zu beobachten war. Somit ist rXYa deutlich besser geeignet als Trypsin, um den Bindemodus von FXa-Inhibitoren zu überprüfen und vorherzusagen, da Trypsin an dieser Position ein Leucin besitzt.

Rest 190 in der S1-Tasche spielt für die globale Positionierung des Substrats (und des Inhibitors) eine untergeordnete Rolle, kann jedoch, wie die kinetischen Daten zeigen, für die exakte Orientierung der zu spaltenden Bindung bedeutsam sein. Durch Herstellen der FXa-Situation in der S1-Tasche von rXYa ist auch hier das Kristallisationsmodell verbessert worden.

Eine Einschränkung der Tauglichkeit von rXYa S190A als Kristallisationsmodell für FXa-Inhibitoren besteht in der S4-Tasche, welche halb von Trypsin- und halb von FXa-Resten gebildet wird. Die S4-Tasche ist zwar hydrophob wie in FXa, jedoch weiter geöffnet und daher weniger spezifisch als die „echte“ FXa-Tasche.

Somit kann mit Hilfe von rXYa S190A zwar die „originalgetreue“ Bindung von FXa-Inhibitoren in S1'-S3 untersucht werden, die Bindung in S4 jedoch ist weniger spezifisch.

VI LITERATURVERZEICHNIS

Afinsen, C.B (1973) Principles that govern the folding of protein chains (nobel lecture). *Science* **181**, 223-230.

Armstrong, N., de Lencastre, A., Gouaux, E. (1999) A new protein folding screen: Application to the ligand binding domains of a glutamate and kainate receptor and to lysozyme and carbonic anhydrase. *Protein Science* **8**, 1475-1483.

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

Birnboim, H.C., Doly, I. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombi-nant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Bisswanger, H. (1979) Theorie und Methoden der Enzymkinetik. *Verlag Chemie Weinheim*, 88-96.

Bode, W., Brandstetter, H., Mather, T., Stubbs, M.T. (1997) Comparative Analysis of Hae-mostatic Proteinases: Structural Aspects of Thrombin, Factor Xa, Factor IXa and Protein C. *Thrombosis and Hemostasis* **78**, 501-511.

Brandstetter, H., Bauer, M., Huber, R., Lollar, P., Bode, W. (1995) X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B. *PNAS* **92**, 9796-9800.

Brandstetter, H., Kühne, A., Bode, W., Huber, R., von der Saal, W., Wirthensohn, K., Engh, R.A. (1996) X-ray Structure of Ative Site-inhibited Clotting Factor Xa. *J. Biol. Chem.* **271**, 29988-29992.

Brinkmann, U., Mattel, R.E., Buckel, P. (1989) High-level of recombinant genes in Escheri-chia coli is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* **85**, 109-114.

Brünger, A.T. (1992a) X-PLOR Version 3.1 A system for X.ray Crystallography and NMR. *Yale University Press, New Haven, CT*.

Brünger, A.T. (1992b) The free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature* **355**, 472-474.

Brünger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., Delano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, N., Pannu, N.S, Read, R.J, Rice, L.M., Simonson, T., Warren G.L. (1998) Crystallography and NMR systems (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst. D* **54**, 905-921.

Burnette, W.N. (1981) 'Western Blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **112**, 195-203.

- Carter, C.W. Jr., Carter, C.W. (1979) Protein crystallization using incomplete factorial experiments. *J. Biol. Chem.* **254**, 12219-12223.
- CCP4 (1994) The CCP4 Suite: Collaborative Computational Project, Number 4. *Acta Cryst.* **D50**, 760-763.
- Castillo, M.J., Kurachi, K., Nishino, N., Ohkubo, I., Powers, J.C. (1983) Reactivity of Bovine Blood Coagulation Factor IX_{aβ}, Factor X_{aβ}, and Factor XI_a toward Fluorogenic Peptides Containing the Activation Site Sequences of Bovine Factor IX and Factor X. *Biochemistry* **22**, 1021-1029.
- Cho, K., Tanaka, T., Cook, R. R., Kisiel, W., Fujikawa, K., Kurachi, K., Powers, J.C. (1984) Active-Site Mapping of Bovine and Human Blood Coagulation Serine Proteases Using Synthetic Peptide 4-Nitroanilide and Thio Ester Substrates. *Biochemistry* **23**, 644-650.
- Creighton, T.E., Darby, N.J., Kemmink, J. (1996) The roles of partly folded intermediates in protein folding. *FASEB Journal* **10**, 110-118.
- Cudney, R., Patel, S., Weisgraber, K., Newhouse, Y., McPherson, A. (1994). Screening and optimization strategies for molecular crystal growth *Acta Cryst.* **D50**, 414-423.
- Davie, E.W., Ratnoff, O.D. (1964) Waterfall sequence for intrinsic blood clotting. *Science* **150**, 1310-1311.
- de Bernandez Clark, E., Schwarz, E., Rudolph, R. (1999) Inhibition of Aggregation Side Reactions during *in Vitro* Protein Folding. *Meth. Enzymol.* **309**, 217-236.
- Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Skelton, N.J., Ultsch, M.H., Santell, L., Dwyer, M.A., O'Connell, M.P., Lazarus, R.A. (2000) Peptide exosite inhibitors of factor VIIa as anticoagulants. *Nature* **404**, 465-470.
- Derman, A.I., Prinz, W., Belin, D., Beckwith, J. (1993) Mutations that allow disulfide bond formation in the cytosol of *Escherichia coli*. *Science* **262**, 1744-1747.
- Di Bella, E.E., Maurer, M.C., Scheraga, H.A. (1995) Expression and folding of recombinant bovine prethrombin-2 and its activation to thrombin. *J. Biol. Chem.* **270**, 163-169.
- Drenth, J. (1994) Principles of Protein X-ray Crystallography. *Springer Verlag*, Berlin.
- Duffy, E.J., Lollar, P. (1992) Intrinsic pathway activation of factor X and its activation peptide-deficient derivative, factor Xdes-143-191. *J. Biol. Chem.* **267**, 7821-7827.
- Engh, R.A., Huber, R. (1991) Accurate bond angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.* **A47**, 392-400.
- Evnin, L.B., Vásquez, J.R., Craik, C.S. (1990) Substrate specificity of trypsin investigated by using a genetic selection. *PNAS* **87**, 6659-6653.

- Fay, P.J., Scandella, D. (1999) Human Inhibitor Antibodies Specific for the Factor VIII A2 Domain Disrupt the Interaction between the Subunit and Factor IXa. *J. Biol. Chem.* **274**, 29826-29830.
- Fiedler, F., Seemüller, U., Fritz, H. (1984) Active site titration of proteinases. *Methods of enzymatic analysis*, V, Bergmeyer (Hrsg), Verlag Chemie GmbH, Weinheim.
- Furie, B., Furie, B.C. (1988) The Molecular Basis of Blood Coagulation. *Cell* **53**, 505-518.
- Giannelli, F., Green, P.M., Sommer, S.S., Poon, M., Ludwig, M., Schwaab, R., Reitsma, P.H., Goossens, M., Yoshioka, A., Figueiredo, M.S., Brownlee, G.G. (1998) Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--eighth edition. *Nucleic Acids Res.* **26**, 265-268.
- Grodberg, J. und Dunn, J.J. (1988) OmpT encodes the Escherichia coli outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *J. Bacteriol.* **170**, 1245-1253.
- Groll, M., Heinemeyer, W., Jäger, S., Ullrich, T., Bochtler, M., Wolf, D.H., Huber, R. (1999) The catalytic sites of 20S proteasomes and their role in subunit maturation: A mutational and crystallographic study. *PNAS* **96**, 10976-10983.
- Hamaguchi, N., Charifson, P.S., Pedersen, L.G., Brayer, G.D., Smith, K.J., Stafford, D.W. (1991). Expression and characterization of human factor IX. *J. Biol. Chem.* **266**, 15213-15220.
- Hedstrom, L., Szilagyi, L., Rutter, W.J. (1992) Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops. *Science* **255**, 1249-1253.
- Higashi, S., Nishimura, H., Aita, K., Iwanaga, S. (1994) Identification of Regions of Bovine Factor VII Essential for Binding to Tissue Factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 18891-18898.
- Higashi, S., Matsumoto, N., Iwanaga, S. (1996) Molecular Mechanism of Tissue Factor-mediated Acceleration of Factor VIIa Activity. *J. Biol. Chem.* **271**, 26569-26574.
- Higashi, S., Matsumoto, N., Iwanaga, S. (1997) Conformation of Factor VIIa Stabilized by a Labile Disulfide Bond (Cys-310-Cys-329) in the Protease Domain Is Essential for Interaction with Tissue Factor. *J. Biol. Chem.* **272**, 25724-25730.
- Hopfner, K.P. (1997) Struktur-Funktionsuntersuchungen an Chimären der Blutgerinnungsfaktoren IXa und Xa. Dissertation, *TU München*.
- Hopfner, K.P., Brandstetter, H., Karcher, A., Kopetzki, E., Huber, R., Engh, R.A., Bode, W. (1997) Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants. *EMBO Journal* **16**, 6626-6635.
- Hopfner, K.P., Kopetzki, E., Kreße, G.B., Bode, W., Huber, R., Engh, R.A. (1998) New enzyme lineages by subdomain shuffling. *PNAS* **95**, 9813-9818.
- Hopfner, K.P., Lang, A., Karcher, A., Sichler, K., Kopetzki, E., Brandstetter, H., Huber, R., Bode, W., Engh, R.A. (1999) Coagulation factor IXa: the relaxed conformation of Tyr99 blocks substrate binding. *Structure* **7**, 989-996.

- Howard, A.J., Gilliland, G.L., Finzel, B.C., Poulos, T.L., Ohlendorf, D.H., Salemme, F.R. (1987) *J. Appl. Cryst.* **20**, 383-387.
- Jancarik, H.K., Kim, S.H. (1991) Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. *J. Appl. Cryst.* **24**, 409-411.
- Johnson, D.J.D., Nugent, P.G., Tuddenham, E.G.D., Harlos, K., Kemball-Cook, G. (1999) Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Active Site-Inhibited Human Coagulation Factor VIIa (des-Gla). *J. Struct. Biol.* **125**, 90-93.
- Kabsch, W. (1988) Automatic indexing of rotation diffraction patterns. *J. Appl. Cryst.* **21**, 67-71.
- Karlsson, P., Doenecke, D., Koolman, J. (1994) Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. *Georg Thieme Verlag Stuttgart*, 499-507.
- Kemball-Cook, G., Johnson, D.J.D., Tuddenham, E.G.D., Harlos, K. (1999) Crystal Structure of Active Site-inhibited Human Coagulation Factor VIIa (des-Gla). *J. Struct. Biol.* **127**, 213-223.
- Kohnert, U., Hellerbrand, K., Martin, U., Stern, A., Popp, F., Fischer, S. (1996) The recombinant Escherichia coli-derived protease domain of tissue-type plasminogen activator is a potent and fibrin specific fibrinolytic agent. *Fibrinolysis*, **10**, 93-102.
- Kolkman, J.A., Lenting, P.J., Mertens, K. (1999) Regions 301-303 and 333-339 in the catalytic domain of blood coagulation Factor IX are Factor VIII-interactive sites involved in stimulation of enzyme activity. *Biochim. J.*, **339**, 217-221.
- Kolkman, J.A., Christophe, O.D., Lenting, P.J., Mertens, K. (1999) Surface Loop 199-204 in Blood Coagulation Factor IX Is a Cofactor-dependent Site Involved in Macromolecular Substrate Interaction. *J. Biol. Chem.*, **274**, 29087-29093.
- Kolkman J.A., Mertens, K. (2000) Insertion Loop 256-268 in Coagulation Factor IX Restricts Enzymatic Activity in the Absence but Not in the Presence of Factor VIII. *Biochemistry*, **39**, 7398-7405.
- Kopetzki, E., Hopfner, K.P., Bode, W., Huber, R. (1997) Autokatalytische Proteinasen und deren Anwendungen. Patent PCT/EP98/05096.
- Kopetzki, E., Rudolph, R., Grossmann, A. (1993) Recombinant core streptavidin. Patent US5489528 und EP612325.
- Lapan, K.A., Fay, P.J. (1997) Localization of a Factor X Interactive Site in the A1 Subunit of Factor VIIIa. *J. Biol. Chem.*, **272**, 2082-2088.
- Lesk, A. M., Fordham, W. D. (1996) Conservation and Variability in the Structures of Serine Proteinases of the Chymotrypsin Family. *J. Mol. Biol.* **258**, 501-537.
- Leslie, A.G.W. (1994). Mosflm User Guide, Mosflm version 5.23. *MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK*.

- Massa, W. (1996) Kristallstrukturbestimmung. *Teubner Studienbücher Chemie, Stuttgart*.
- McRae, B.J., Kurachi, K., Heimark, R.L., Fujikawa, K., Davie, E.W., Powers, J.C. (1981) Mapping the active sites of bovine thrombin, factor IXa, factor Xa, factor XIa, factor XIIa, plasma kallikrein and trypsin with amino acid and peptide thioesters: development of new sensitive substrates. *Biochemistry* **20**, 7196-7206.
- Monkovic, D. D., Tracy, P. B. (1990) Activation of human factor V by factor Xa and thrombin. *Biochemistry* **29**, 1118-1128.
- Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Cryst.* **A50**, 157-163.
- Neurath, H. (1984) Evolution of proteolytic enzymes. *Science* **224**, 350-357.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lapan, K.A., Fay, P.J. (1997) Localization of a Factor X Interactive Site in the A1 Subunit of Factor VIIIa. *J. Biol. Chem.* **272**, 2082-2088.
- Larson, P.J., Stanfield-Oakley, S.A., VanDusen, W.J., Kasper, C.K., Smith, K.J., Monroe, D.M, High, K.A. (1996) Structural Integrity of the γ -Carboxyglutamic Acid Domain of Human Blood Coagulation Factor IXa Is Required for Its Binding to Cofactor VIIIa. *J. Biol. Chem.* **271**, 3869-3876.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Mass, S.D, Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291.
- Lottenberg, R., Christensen, U., Jackson, C.M., Coleman, P.L. (1981) Assay of coagulation proteases using peptide chromogenic and fluorogenic substrates. *Meth. Enzymol.* **80**, 341-361.
- Lozier, J.N., Monroe, D.M., Stanfield-Oakley, S., Lin, S.-W., Smith, K.J., Roberts, H.R., High, K.A. (1990) Factor IX New London: Substitution of proline for glutamine at position 50 causes severe hemophilia B. *Blood* **75**, 1097-1104.
- MacFarlane, R.G. (1964) An enzyme cascade in the blood clotting mechanism and its function as a biochemical amplifier. *Nature* **202**, 408-409.
- McPherson, A. (1976) The growth and preliminary investigation of protein and nucleic acid crystals for X-ray diffraction analysis. *Methods Biochem. Anal.* **23**, 249-354.
- Morrissey, J.H., Macik, B.G., Neuenschwander, P.F., Comp, P.C. (1993) Quantitation of Activated Factor VII Levels in Plasma Using a Tissue Factor Mutant Selectively Deficient in Promoting Factor VII Activation. *Blood* **81**, 734-744.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro with a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**, 335-350.

- Murshudov, G.N., Vagin, A.A., Dodson, E.J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Cryst. D* **53**, 240-255.
- Neuenschwander, P.F., Morrissey, J.H. (1994) Roles of the Membrane-interactive Regions of Factor VIIa and Tissue Factor. *J. Biol. Chem.* **269**, 8007-8013.
- Neuenschwander, P.F., Branam, D.E., Morrissey, J.H. (1993) Importance of Substrate Composition, pH and Other Variables on Tissue Factor Enhancement of Factor VIIa Activity. *Thrombosis and Hemostasis* **70**, 970-977.
- O'Brien, L.M., Medved, L.V., Fay, P.J. (1995) Localization of Factor IXa and Factor VIIIa Interactive Sites. *J. Biol. Chem.* **270**, 27087-27092.
- Otwinowski, Z. (1993) Data Collection and Processing (eds Sawyer, L., Isaacs, N, Bailey, S.), SERC Daresbury Laboratory, Warrington, 56-62.
- Padmanabhan, K., Padmanabhan, K.P., Tulinsky, A., Park, C.H., Bode, W., Huber, R., Blankenship, D.T., Cardin, A.D., Kisiel, W. (1993) Structure of the human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **232**, 947-966.
- Petersen, L.C., Olsen, O.H., Nielsen, L.S., Freskgard, P.-O., Persson, E. (2000) Binding of Zn²⁺ to a Ca²⁺ loop allosterically attenuates the activity of factor VIIa and reduces its affinity for tissue factor. *Protein Science* **9**, 859-866.
- Petrovan, R.J., Ruf, W. (2000) Role of Residue Phe²²⁵ in the Cofactor-Mediated, Allosteric Regulation of the Serine Protease Coagulation Factor VIIa. *Biochemistry* **39**, 14457-14463.
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Roberts, S.M., Olsen, O.H., Persson, E. (1999) Structure of human factor VIIa and its implications for the triggering of blood coagulation. *PNAS* **96**, 8925-8930.
- Rezaie, A.R. (1996) Role of Residue 99 at the S2 subsite of Factor Xa and Activated Protein C in Enzyme Specificity. *J. Biol. Chem.* **271**, 23807-23814.
- Roberts, H.R. (1993) Molecular Biology of Hemophilia B. *Thromb Haemost*, **70** 1-9.
- Rock, G., Wells, P. (1997) New Concepts in Coagulation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, **34**, 475-501.
- Rosing, J., Tans, G., Govers-Riemslog, J.W.P., Zwaal, R.F.A, Hemker, H.C. (1980) The role of phospholipids and factor Va in the prothrombinase complex. *J. Biol. Chem.* **255**, 274-283.
- Rudolph, R., Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB* **10**, 49-56.
- Petrovan, R.J., Ruf, W. (2000) Role of Residue Phe²²⁵ in the Cofactor-Mediated, Allosteric Regulation of the Serine Protease Coagulation Factor VIIa. *Biochemistry* **39**, 14457-14463.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- Schechter, I., Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **20**, 157-62.
- Schellenberger, V., Turck, C.W., Hedstrom, L., Rutter, W.J. (1993) Mapping the S' Subsites of Serine Proteases Using Acyl Transfer to Mixtures of Peptide Nucleophiles. *Biochemistry* **32**, 4349-4353.
- Schwarz, E., Lilie, H., Rudolph, R. (1996) The effect of molecular chaperones on in vivo and in vitro folding processes. *Biol. Chem.* **377**, 411-416.
- Stryer, L. (1988) *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, 226-227.
- Stürzebecher, J., Kopetzki, E., Bode, W., Hopfner, K.-P. (1997) Dramatic enhancement of the catalytic activity of coagulation factor IXa by alcohols. *FEBS Letters* **412**, 295-300.
- Thim, L., Bjoern, S., Christensen, M., Nicolaisen, E.M., Lund-Hansen, T., Petersen, A.H., Hedner, U. (1988) Amino acid sequence and posttranslational modifications of human factor VIIa from plasma and transfected baby hamster kidney cells. *Biochemistry* **27**, 7785-7793.
- Turk, D. (1992) Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen. Dissertation, *TU München*.
- Veneki, I., Graf, L., Rutter, W.J. (1996) Expression of rat chymotrypsinogen in yeast: a study on the structural and functional significance of the chymotrypsinogen propeptide. *FEBS Letters* **379**, 139-142.
- Vijaya Mohan Rao, L., Rapaport, S., Hoang, A.D. (1993) Binding of Factor VIIa to Tissue Factor Permits Rapid Antithrombin III / Heparin Inhibition of Factor VIIa. *Blood* **81**, 2600-2607.
- Wolf, D.L., Sinha, U., Hancock, T.E., Lin, P.-H., Messier, T.L., Esmon, C.T., Church, W.R. (1991) Design of constructs for the expression of biologically active recombinant human factors X and Xa. *J. Biol. Chem.* **266**, 13726-13730.
- Zhang, E., Charles, R.St., Tulinsky, A. (1999) Structure of Extracellular Tissue Factor Complexed with Factor VIIa Inhibited with a BPTI Mutant. *J. Mol. Biol.* **285**, 2089-2104.

VII ABKÜRZUNGEN

4-NPGB	4-Nitrophenyl 4'-Guanidinobenzoat
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/w)	Gewichtsprozent
Å	Ångström (10^{-10} m)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATIII	Antithrombin III
BA	Benzamidin
Bz	Benzyl
CB	Carbobenzoxy
CD	katalytische Domäne
CHA	Cyclohexylalanyl
CV	Säulenvolumen (<i>column volume</i>)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EG	Ethylenglycol
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
FM	Feuchtmasse
Gla	γ -Carboxyglutaminsäure
GOL	Glycerin
GSSG	Glutathion oxidiert
GSH	Glutathion reduziert
GdmCl	Guanidinium-HCl
IB	Inclusion Bodies
LB	Luria Bertani (Nährmedium)
kDa	Kilodalton
MOC	Methoxycarbonyl
MS	Methylsulfonyl
Nle	Norleucyl
OD	optische Dichte
PABA	p-Aminobenzamidin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pNA	Para-Nitroanilid
PPACK	H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon
rF7	rekombinanter Gerinnungsfaktor VII
rF9	rekombinanter Gerinnungsfaktor IX
rF10	rekombinanter Gerinnungsfaktor X
rTry	rekombinantes Trypsin
RT	Raumtemperatur (20°C)
RVV	Russels Viper Venom
RVV-X	Faktor X-Aktivator aus RVV
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TM	Trockenmasse
Tos	Tosyl
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ÜN	über Nacht