

Kristallographische und biophysikalische Untersuchungen an Serinproteinase-Effektor-Komplexen

Rainer Friedrich
Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Strukturforschung
82152 Martinsried

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

Kristallographische und biophysikalische Untersuchungen an Serinproteinase-Effektor-Komplexen

Rainer Friedrich

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. Wolfgang Hiller
Prüfer der Dissertation: apl. Prof. Dr. Dr. h.c. Robert Huber
Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner
apl. Prof. Dr. Wolfram Bode, Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 07. 11. 2002 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Chemie am 11. 12. 2002 angenommen.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Friedrich, R; Fuentes-Prior, P; Ong, E; Coombs, G; Hunter, M; Oehler, R; Pierson, D; Gonzalez, R; Huber, R; Bode, W und Madison, EL (2002) *Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase*. J. Biol. Chem. **277**(3): 2160-8.

Friedrich, R; Steinmetzer, T; Huber, R; Stürzebecher, J und Bode, W (2002) *The methyl group of N^a(Me)Arg-containing peptides disturbs the active-site geometry of thrombin, impairing efficient cleavage*. J. Mol. Biol. **316**(4): 869-874.

Kongreßberichte über Bestandteile dieser Arbeit:

Friedrich, R; Bode, W; Madison, EL (2001) Crystal structure of the catalytic domain of MTSP-1, a type-II transmembrane serine proteinase implicated in cancer. Vortrag beim 2. *General Meeting of the International Proteolysis Society*, November 2001, Freising, Deutschland, als eingeladener Sprecher

Friedrich, R; Bode, W; Madison, EL (2002) Crystal structures of the catalytic domain of MTSP-1/matriptase. Posterpräsentation beim 1. *International congress on Molecular Staging Of Cancer*, Dezember 2002, München, Deutschland

Friedrich, R; Bode, W; Madison, EL (2002) Crystal structure of the catalytic domain of MTSP-1, a type-II transmembrane serine proteinase implicated in cancer. Vortrag bei *Keystone Symposia on Proteolytic Enzymes as Therapeutic Targets*, Februar 2002, Keystone, USA, als eingeladener Sprecher

Friedrich, R; Bode, W; Madison, EL (2002) Crystal structures of the catalytic domain of MTSP-1/matriptase. Posterpräsentation bei *Gordon Research Conference on Proteolytic Enzymes and Their Inhibitors*, Juli 2002, New London, USA

Friedrich, R; Panizzi P; Richter, K; Kawabata, SI; Bock, PE; Fuentes-Prior, P; Bode, W (2002) Structure and Function of Serine Proteinase Zymogen Activators. Vortrag beim 16. Internationalen Kongreß der *International Society for Fibrinolysis and Proteolysis*, September 2002, München, Deutschland, als eingeladener Sprecher

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Patente:

Protease-Inhibitoren, Az. DE 101 24 041

Inhalt

1	Einführung	1
1.1	Proteolyse	1
1.1.1	Metalloproteinasen	2
1.1.2	Aspartatproteinasen	3
1.1.3	Cysteinproteinasen	3
1.1.4	Serinproteinasen	4
1.2	Blutgerinnung	5
1.2.1	Blutplättchen (Thrombozyten)	6
1.2.2	Intrinsisches System	7
1.2.3	Extrinsisches System	8
1.2.4	Gemeinsame Endschritte	9
1.2.5	Fibrinolyse	10
1.2.6	Gerinnungsstörungen	11
1.2.7	Die Faktoren der Blutgerinnung	12
1.2.7.1	Prothrombin	13
1.2.7.2	Fibrinogen	16
1.3	Inhibition von Thrombin	17
1.4	Bakterielle Zymogenaktivatoren	18
1.4.1	Plasminogen-Aktivatoren	20
1.4.1.1	Streptokinase	20
1.4.1.2	Staphylokinase	21
1.4.1.3	Pla und die Omptin-Familie	22
1.4.1.4	Weitere Plasminogen-Aktivatoren	23
1.4.2	Staphylocoagulase	23
1.4.2.1	Struktur und Funktion	23
1.4.2.2	Klinische Relevanz	24
1.5	Proteinasen im Krebsgeschehen	26
1.5.1	Serinproteinasen	26
1.5.2	Typ-II-Transmembran-Serinproteinasen (TTSPs)	27
1.5.3	MT-SP1	29

2	Thrombin-Inhibitoren auf der Basis von N_a-Methyl-Arginin	33
2.1	Ergebnisse	33
2.2	Diskussion	35
3	Struktur und biophysikalische Charakterisierung von Staphylocoagulase und Komplexen	37
3.1	Ergebnisse	37
3.1.1	Wechselwirkung von STC mit (Pro)Thrombin und Fibrinogen	38
3.1.2	Struktur von STC–Thrombin	38
3.1.3	Struktur von mSTC	41
3.1.4	Wechselwirkung zwischen mSTC und Thrombin	42
3.2	Diskussion	45
3.2.1	Struktur von STC	45
3.2.2	Molekulare Sexualität	45
3.2.3	Wechselwirkungen im STC–Prothrombin-Komplex und mit Fibrinogen	46
3.2.4	Aktivierungsmechanismus	47
3.2.5	Perspektiven	47
4	Strukturen der katalytischen Domäne von MT-SP1	49
4.1	Ergebnisse	49
4.1.1	Struktur der katalytischen Domäne im Komplex mit Benzamidin	49
4.1.1.1	Loops um das aktive Zentrum	51
4.1.1.2	Aktives Zentrum und Substratbindetaschen	52
4.1.2	Wechselwirkung von MT-SP1 mit Kunitz-Typ-Inhibitoren	53
4.2	Diskussion	55
5	Materialien und Methoden	59
5.1	Chemikalien und Geräte	59
5.2	Molekularbiologische Methoden	59
5.2.1	Herstellung elektrokompetenter Zellen	59
5.2.2	Transformation	59
5.2.3	Glyzerinkulturen	60
5.3	Arbeiten mit Proteinen	60

5.3.1	Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	60
5.3.2	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
5.3.3	Färben von Proteingelen	61
5.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	61
5.4	Expression und Reinigung von STC1 -327 (mSTC)	61
5.5	Reinigung von Thrombin	62
5.5.1	Reinigung aus humanem oder bovinem Plasma	62
5.5.2	Aktivierung	63
5.5.3	Kopplung der Schlangengift-Proteinase an Affigel	63
5.6	Biochemische Methoden	63
5.6.1	Analytische Ultrazentrifugation	63
5.6.2	CD-Spektroskopie	63
5.6.3	Biacore-Messungen	64
5.7	Kristallographische Methoden	64
5.7.1	Datensammlung	64
5.7.2	Datenauswertung	65
5.7.2.1	Lösung des Phasenproblems	65
5.7.2.2	Dichtemodifikation / Phasenkombination	65
5.7.3	Modellbau / Verfeinerung	66
5.7.4	Analyse des Modells	66
5.7.5	Graphische Darstellung	66
6	Literatur	67
	Anhang	87
	Kristallographische Begriffe	87
	Kristallographische Daten	90
	• Thrombin-I-11	90
	• Staphylocoagulase	90
	• MT-SP1	91
	Abkürzungen	92
	Verwendete Nomenklatur der Aminosäuren	93

Zusammenfassung

N_{α} -Methyl-Arginin als P1-Rest stellt ein kombiniertes „Prolin- und Arginin-Analogon“ dar und ermöglicht damit stabile Peptidmimetika mit hoher Affinität. Die Bindungsweise eines Thrombininhibitors mit dieser Aminosäure wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht. I11 wurde mit humanem α -Thrombin kokristallisiert und die Kristallstruktur bis zu einer Auflösung von 1,8 Å bestimmt. Die vorliegende Struktur erklärt die stark reduzierte Reaktivität der N_{α} -Methyl-Arginin-Xaa-Bindung, die auf der „Abstandshalter“-Wirkung der Methylgruppe und einer verzerrten katalytischen Triade beruht. Damit wurden nicht nur Informationen über die Wechselwirkungen innerhalb des I11-Thrombin-Komplexes gewonnen, sondern auch gezeigt, daß die Methylierung eines basischen P1-Restes generell für den Entwurf relativ stabiler Mimetika von Serinproteinase-Substraten und -Inhibitoren geeignet ist.

Die Staphylocoagulasen sind Proteine aus *Staphylococcus aureus* mit der Fähigkeit, menschliches Plasma gerinnen zu lassen. Sie bilden mit Prothrombin einen aktiven 1:1-Komplex, der unter Umgehung der physiologischen Gerinnungskaskade Fibrinogen spalten und damit Fibrin bilden kann. Dafür ist, im Gegensatz zum normalen Aktivierungsmechanismus, keine proteolytische Spaltung von Prothrombin erforderlich. Es wurden im Rahmen dieser Arbeit die Kristallstrukturen eines aktiven STC-Fragments mit Thrombin und Präthrombin-2 bis zu einer maximalen Auflösung von 2,1 Å gelöst. STC besitzt eine bislang uncharakterisierte Struktur aus zwei α -helikalen Domänen, die mit der Faltung von Staphylokinase und Streptokinase nicht verwandt sind. Der bakterielle Kofaktor stabilisiert eine aktive Konformation in Prothrombin durch die Insertion seines N-Terminus in die Aktivierungstasche des Zymogens. Dies bestätigt die Molekulare-Sexualität-Hypothese. Diese Erkenntnisse könnten neue Therapien ermöglichen, die auf der Verhinderung schädlicher, durch bakterielle Kofaktoren induzierter Prozesse basieren.

Die membranständige humane Serinproteinase MT-SP1 könnte direkte und indirekte Rollen in Zellwachstum und -migration sowie bei Angiogenese, Tumorwachstum und -progression spielen. Die Spezifität von MT-SP1 unterscheidet sich grundsätzlich von Trypsin, da MT-SP1 nicht unterschiedslos Peptidsubstrate nach zugänglichen Lysin- oder Argininresten spaltet, sondern zusätzliche Aminosäuren rund um die zu spaltende Peptidbindung erkennen muß. In dieser Arbeit wurden die Kristallstrukturen von der katalytischen Domäne von MT-SP1 mit Benzamidin (1,3 Å) und BPTI (2,9 Å) aufgeklärt. Die katalytische Domäne des menschlichen MT-SP1 besitzt die Faltung einer chymotrypsinartigen Serinproteinase, aber darüber hinaus einige charak-

teristische Eigenschaften wie die hydrophoben/sauren S2/S4-Bindetaschen und einen exponierten 60-*loop*, die die Substraterkennungs- und -bindungseigenschaften stark beeinflussen. Die Kristallstrukturen von MT-SP1 in Komplex mit den Inhibitoren Benzamidin und BPTI stellen einen ersten Schritt in die Richtung des Designs spezifischer Inhibitoren gegen dieses höchstwahrscheinlich an Tumorprozessen beteiligten Enzyms dar.

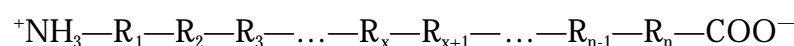
1 Einführung

1.1 Proteolyse

Die durch eine Peptidase katalysierte hydrolytische Spaltung einer Peptidbindung wird Proteolyse genannt. Man unterscheidet zwei Kategorien:

- limitierte Proteolyse: Eine Proteinase spaltet eine einzige oder nur wenige, meist sehr spezifische Peptidbindungen eines Zielproteins, was zu dessen Aktivierung oder Prozessierung führt (Hubbard, 1998).
- unlimitierte Proteolyse: Proteine werden in ihre Aminosäurebestandteile oder kleine Peptide zerlegt. Dafür werden sie normalerweise zuerst an das Protein Ubiquitin gekoppelt, was sie für schnelle ATP-abhängige Hydrolyse durch das Proteasom markiert (Glickman und Ciechanover, 2002). Sie können jedoch auch in ein Zellkompartiment wie Lysosomen transferiert werden, wo sie durch verschiedene Enzyme schnell abgebaut werden (Pillay *et al.*, 2002).

Die *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) schlug 1984 die Verwendung des Begriffs „Peptidase“ für die Enzymuntergruppe der Peptidbindungshydrolyasen vor (EC 3.4). Der weitverbreitete Name „Protease“ ist damit synonym. Eine Exopeptidase (EC 3.4.11-19) spaltet eine oder nacheinander wenige Aminosäuren vom N- oder C-Terminus eines Substrates ab, eine Endopeptidase (EC 3.4.21-99) hydrolysiert „interne“ Peptidbindungen abseits des N- oder C-Terminus. Die Endopeptidasen werden auch Proteinasen genannt (Barrett *et al.*, 1998).



Aminopeptidase (Exopeptidase)	Endopeptidase	Carboxypeptidase (Exopeptidase)
----------------------------------	---------------	------------------------------------

Abbildung 1: Spaltstellen verschiedener Peptidasen

Zur Hydrolyse der Peptidbindung wird ein Protonendonator oder eine Base sowie ein Nukleophil benötigt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind fünf mechanistische Proteinaseklassen bekannt: Metallo-, Aspartat-, Cystein-, Threonin- und Serin-Proteinasen. Die jeweiligen Mechanismen unterscheiden sich fundamental. Bei Serin-, Threonin- und Cystein-Proteinasen ist das Nukleophil Teil der Seitenkette von Serin, Threonin bzw. Cystein, bei Aspartat- und Metalloproteinasen jedoch ein aktiviertes Wassermolekül.

Die Nomenklatur zur Beschreibung der Bindetaschen zur spezifischen Erkennung eines Substrats wurde 1967 eingeführt (Schechter und Berger, 1967). Die Bindetaschen (*subsites*) für die

Aminosäuren des Substrats werden mit dem Buchstaben S bezeichnet, während die Aminosäuren, die dort binden, P genannt werden. Von der zu spaltenden Peptidbindung in Richtung des N-Terminus werden die Aminosäuren mit P1, P2, P3 usw. durchnummeriert. Für die Bezeichnung in Richtung des C-Terminus werden die Symbole P1', P2', P3' usw. verwendet. Die zu spaltende Bindung (\downarrow) liegt somit zwischen P1 und P1'. Entsprechend werden die Bindetaschen ...S3 S2 S1

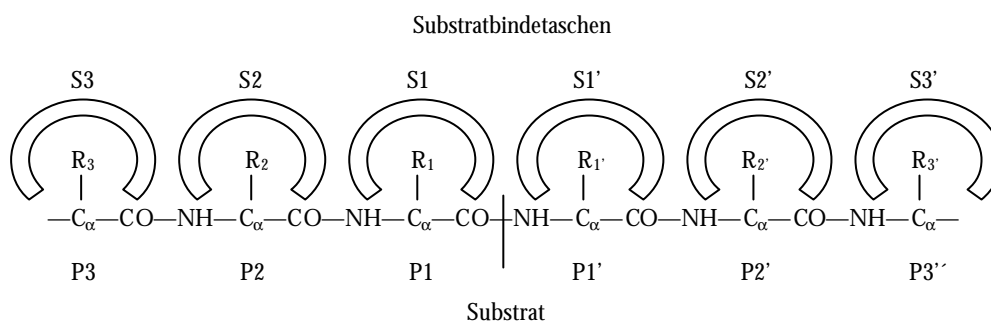


Abbildung 2: Nomenklatur von Substratbindetaschen und Substratresten nach Schechter und Berger

\downarrow S1' S2', S3'... genannt:

1.1.1 Metalloproteinasen

Metalloproteinasen besitzen ein katalytisch aktives zweiwertiges Kation (Zn^{2+}), das die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung noch stärker polarisiert und damit die nukleophile Attacke auf die Peptidbindung durch ein glutamatgebundenes Wasser ermöglicht. Oft ist das Zinkion durch zwei Histidinreste (meist in der Sequenz HEXXH) und ein Glutamat (z.B. Thermolysin) bzw. ein drittes Histidin (z.B. Astacin) gebunden, es gibt jedoch auch andere Möglichkeiten zur Bindung von Kationen (Hooper, 1994).

Die Metzincine sind eine Untergruppe der Metalloproteinasen, die Zink über das verlängerte Motiv HEXXHXXGXXH binden. Alle Metzincine besitzen ein konserviertes Methionin (im sogenannten „Met-turn“), das zur Stabilisierung des aktiven Zentrums beiträgt, und eine typische Faltung in ein fünfsträngiges β -Faltblatt und drei α -Helices (Bode *et al.*, 1996; Stöcker und Bode, 1995).

Die Matrix-Metalloproteinasen (Matrixine, MMPs) sind eine Untergruppe der Metzincine und zerfallen in vier Gruppen, je nach Substratspezifität oder Domänenstruktur. Alle MMPs außer den beiden kleinsten (Matrilysin und MMP26) enthalten eine Hämpoxin- (oder Vitronectin-) artige Domäne, die mit der katalytischen Domäne über ein prolinreiches Scharnier verbunden ist und zur Substraterkennung beiträgt (McCawley und Matrisian, 2001). Eine Untergruppe, die der MT-MMPs (MMP14-17, 24-25), zeichnet sich durch eine C-terminale Transmembrandomäne

bzw. eine GPI-Erkennungsregion aus. Dadurch kommt die katalytische Domäne auf der Zelloberfläche zu liegen, wo sie unter anderem pro-Gelatinase A aktiviert (Johnson *et al.*, 1998). Die MMPs werden durch mindestens vier physiologische Inhibitoren reguliert (*tissue*-Inhibitoren der Metalloproteinasen, TIMPs), von denen jeder eine spezifische Rolle zu spielen scheint (Fassina *et al.*, 2000).

Die ADAMs (*a disintegrin and metalloproteinase domain*) sind eine Familie von mehr als 21 Mitgliedern mit Rollen bei Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Sie alle besitzen eine Pro-, eine Metalloproteinase-, eine disintegrinartige, eine cysteinreiche, eine EGF-artige, eine Transmembran- und eine cytoplasmatische Domäne (Wolfsberg *et al.*, 1995). Durch Wechselwirkungen von ADAMs mit Integrinen werden Zellen in Kontakt mit anderen Zellen oder extrazellulärer Matrix gebracht. Die katalytischen Domänen der ADAMs gehören zur Familie der Reprolysinen oder Adamalysinen mit einem konservierten HEXGHXXGXXHD-Motiv (Primakoff und Myles, 2000).

1.1.2 Aspartatproteinasen

Die meisten Aspartatproteinasen gehören zur Pepsin-Familie, die sowohl Verdauungsenzyme wie Pepsin und Chymosin als auch das lysosomale Kathepsin D sowie prozessierende Enzyme wie Renin umfaßt. Eine zweite Familie enthält virale Proteinasen (Retropepsine, z.B. HIV-Proteinase; Rawlings und Barrett, 1995). Aspartatproteinasen bestehen aus zwei homologen, meist durch Genduplikation entstandenen Domänen, zwischen denen die Aminosäuren des aktiven Zentrums angeordnet sind (Tang *et al.*, 1978). Jede Domäne trägt einen Aspartylrest zur katalytischen Dyade bei, D32 und D215 in Pepsin-Numerierung. Eines der beiden Aspartate ist bei dem für die Katalyse idealen pH-Wert ionisiert, das andere nicht. Retropepsine sind jedoch Monomere und dimerisieren zu ihrer Aktivierung. Die nukleophile Attacke erfolgt über zwei gleichzeitige Protonenübertragungen: von einem Wassermolekül zur katalytischen Dyade und von der Dyade auf den Carbonylsauerstoff des Substrats unter Spaltung der Peptidbindung. Diese Säure-Base-Katalyse („*push-pull*“-Mechanismus) verläuft über einen nichtkovalenten tetraedrischen Übergangszustand (Polgar, 1987).

1.1.3 Cysteinproteinasen

Zu den Cysteinproteinasen gehören neben den Legumainen, Gingipainen und Caspasen die papainähnlichen Cysteinproteinasen, die lysosomalen Kathepsine B, H, L und S in Säugetieren, die cytosolischen calciumaktivierten Calpaine sowie Proteinasen aus Parasiten (z.B. Trypanosoma; Rawlings und Barrett, 1994). Beim Katalysevorgang, an dem ein Cystein (C25 in der Papain-Numerierung) und ein Histidin (H159) beteiligt sind, bildet sich ein kovalentes tetraedrisches

Zwischenprodukt (Angelides und Fink, 1979). Das Thiolat-Ion von C25, das als Nukleophil fungiert, wird durch die Bildung eines Ionenpaars mit der benachbarten Imidazoliumgruppe von H159 stabilisiert (Polgar, 1974).

1.1.4 Serinproteinasen

Die evolutionär erfolgreichste Klasse der Serinproteinasen umfaßt sechs „clans“ (Barrett und Rawlings, 1995). Der Chymotrypsin-*clan* (*clan* A) enthält Säugerenzyme wie Chymotrypsin, Trypsin, Elastase oder Kallikrein, der Subtilisin-*clan* (B) die Furine, viele bakterielle Proteinasen (z.B. Subtilisin) und die α/β -Hydrolasen. Diese beiden Familien unterscheiden sich in der Sequenz und Faltung, nicht jedoch in der Geometrie des aktiven Zentrums und im Katalysemechanismus und haben sich folglich konvergent aus verschiedenen Ursprüngen entwickelt. Trotz hoher Homologie in ihrer Primärstruktur besitzen die Serinproteinasen äußerst verschiedene Substratspezifitäten, die auf Aminosäuresubstitutionen in den Bindungstaschen beruhen. Die niedrigste Stufe der Spezifität ist auf die P1-Position beschränkt, die meisten Enzyme weisen jedoch eine erweiterte Wechselwirkungsfläche mit dem Substrat auf.

Drei Reste sind für die Katalyse essentiell: H57, D102 und S195 (Chymotrypsinogen-

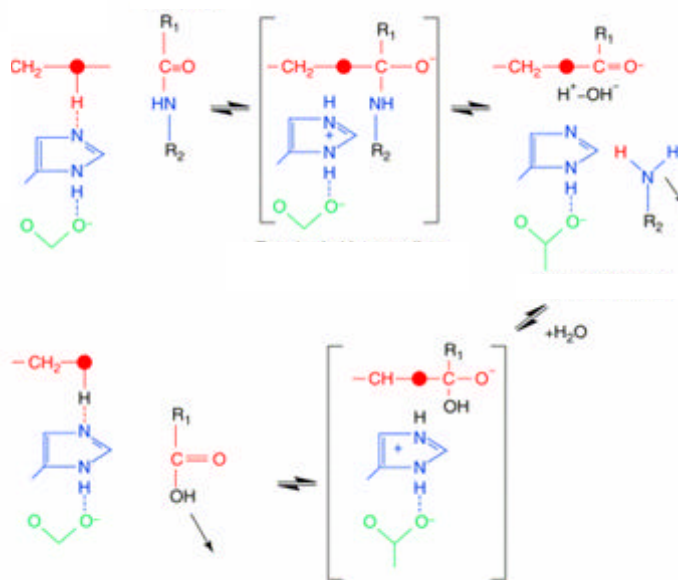


Abbildung 3: Mechanismus der Peptidbindungsspaltung bei Serinproteinasen

Numerierung). Sie bilden die sogenannte „katalytische Triade“ (Dodson und Wlodawer, 1998). Der erste katalytische Schritt ist eine Acylierung, wobei über einen negativ geladenen tetraedrischen Übergangszustand unter Spaltung der Peptidbindung ein kovalentes Acyl-Enzym-Zwischenprodukt zwischen dem Substrat und dem Serin entsteht. Bei der Deacylierung erfolgt ein nucleophiler Angriff eines Wassermoleküls auf diesen labilen Komplex, wobei das Peptid freigesetzt und die Hydroxylgruppe des S195 wiederhergestellt wird. H57 agiert als Base und übernimmt ein Proton vom reaktiven Serin (Kraut, 1977).

Die erste dreidimensionale Kristallstruktur einer chymotrypsinartigen Serinproteinase wurde 1967 von α -Chymotrypsin bestimmt (Matthews *et al.*, 1967). Aus diesem Grunde dient die Struktur dieses Enzyms als Referenz und die Numerierung seiner Aminosäuren (beginnend mit 16) wird verwendet, um topologisch äquivalente Aminosäuren in anderen Proteinen der Familie zu bezeichnen (Chymotrypsinogen-Numerierung). Dabei erhalten im Vergleich zu Chymotrypsinogen inserierte Reste ein Buchstabensuffix (A, B, C...).

Eine Serinproteinase oder eine Serinproteinasedomäne besteht aus zwei sechssträngigen antiparallelen β -Faltblättern (β -barrel), die in einem *greek-key*-Motiv angeordnet sind (β 1-4), gefolgt von einer antiparallelen Haarnadelschleife (β 5/6). An der Grenze zwischen den beiden *barrels* liegen die Reste der katalytischen Triade, wobei H57 und D102 in Subdomäne I, S195 aber in Subdomäne II liegen (Blow, 1968). Die Rückgrat-Amide von X193 und S195 bilden die sogenannte „Oxyanion-Tasche“ (Robertus *et al.*, 1972), in die die Carbonylgruppe der zu spaltenden Peptidbindung zu liegen kommt.

Die Aktivierung aller S1-Serinproteinasen erfolgt nach demselben Muster (Stroud *et al.*, 1977). Die aktivierende Proteinase spaltet die R15–X16-Bindung, wonach sich der neugebildete H_3N^+ –X16-Aminoterminus ins Innere des Proteins faltet und dort eine starke, vom Solvens abgeschirmte Salzbrücke mit D194 bildet. Durch diese relativ (auf die so bezeichnete „Aktivierungsdomäne“) begrenzte Umlagerung wird die aktive Konformation stabilisiert (Sigler *et al.*, 1968; Bode und Huber, 1976; Bode, 1979). Die Spaltung kann unter Umgehung physiologischer Aktivierungskaskaden auch von bakteriellen Proteinase (z. B. Pla aus *Yersinia pestis*) durchgeführt werden (Sodeinde *et al.*, 1992). Gewisse bakterielle Proteine sind darüber hinaus in der Lage, Serinproteinasen ohne Spaltung der R15–X16-Bindung zu aktivieren (Parry *et al.*, 2000). Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit wird sich mit einem bakteriellen nichtproteolytischen Prothrombin-Aktivator, der Staphylocoagulase, beschäftigen.

1.2 Blutgerinnung

Der Prozeß von Blutgerinnung und darauffolgender Auflösung des Gerinnsels nach Reparatur des verletzten Gewebes wird Hämostase genannt. Zwei Systeme arbeiten dafür zusammen: ein humorales System, basierend auf löslichen Faktoren (F), und ein partikuläres System, repräsentiert durch die Thrombozyten (Blutplättchen) und das Gefäßendothel. Vier Hauptereignisse können unterschieden werden:

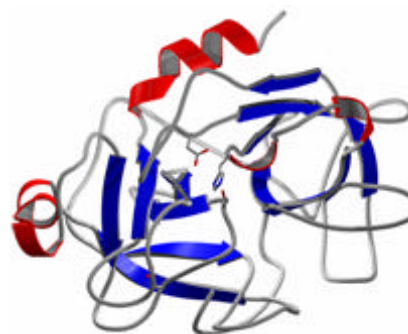


Abbildung 4: Faltung von α -Chymotrypsin (nach Matthews *et al.*, 1967)

1. Gefäßverengung (Vasokonstriktion). Der Blutfluß zur verletzten Stelle wird verringert (Frelin, 1991).
2. Thrombozytenaggregation. Verschiedene Stimuli führen zur Aktivierung von Blutplättchen, die an der verwundeten Stelle an Kollagen binden und zu einem temporären Plättchenklumpen aggregieren. Aktivierte Plättchen setzen ADP, Phospholipide, Lipoproteine und Vasokonstriktoren wie Serotonin und Thromboxan frei (Savage *et al.*, 2001).
3. Bildung eines Fibrinnetzwerks. Ein Fibringerinnsel bildet sich und fixiert den Thrombozytenklumpen. Ein Klumpen mit ausschließlich Blutplättchen wird weißer Thrombus genannt, enthält er jedoch auch rote Blutzellen, roter Thrombus (Sidelmann *et al.*, 2000).
4. Auflösung des Gerinnsels. Durch die Einwirkung von Plasmin wird das Fibrinnetzwerk aufgelöst und der normale Blutfluß wiederhergestellt (Booth, 1999).

Die schrittweise Aktivierung der Proteinase-Zymogene durch aufeinanderfolgende proteolytische Spaltung wurde in mehreren physiologischen Prozessen beobachtet. Schon 1964 wurde der Begriff Kaskade oder Wasserfall für die Abläufe während der Gerinnung geprägt (Davie, 1964; McFarlane, 1964), später jedoch auch für die Aktivierung des Komplementsystems oder die Dorsal-Ventral-Polarisierung bei der *Drosophila*-Entwicklung verwendet. Sie scheinen von einem alten Abwehrsystem abzustammen, das sowohl für die Immobilisierung und Abtötung von Pathogenen als auch gegen den Verlust von Körperflüssigkeiten eingesetzt wurde (Bergner *et al.*, 1997; Krem und di Cera, 2002).

Zwei Systeme führen zur Bildung eines Fibringerinnsels. Ausgelöst durch verschiedene Mechanismen, münden sie doch in einen gemeinsamen Endteil. Beide Wege führen über eine Anzahl von verschiedenen Proteinen, die Gerinnungsfaktoren genannt werden (Stubbs und Bode, 1994). Durch diese Kaskade mit positiver und negativer Rückkopplung wird der Prozeß der Blutgerinnung um mehrere Größenordnungen amplifiziert und gleichzeitig lokal auf die Stelle der Gefäßverletzung begrenzt.

1.2.1 Blutplättchen (Thrombozyten)

Blutplättchen (Thrombozyten) sind kleine kernlose, scheibchenförmige Blutzellenpartikel. Als Antwort auf die Verletzung eines Gefäßes heften sich die Thrombozyten sofort an exponierte Kollagenfasern in der Gefäßwand an und bilden einen transienten lockeren Klumpen (Savage *et al.*, 2001). Bei dieser Aggregation werden sie aktiviert und setzen verschiedene Moleküle aus intrazellulären Speichern (*granules*) frei, unter anderem Fibrinogen, Thrombospondin und Faktor V sowie ADP, Thromboxan A_2 und Serotonin (Andrews *et al.*, 1997).

Die Aktivierung führt zu signifikanten Änderungen in Form und Membranzusammensetzung der Plättchen, die eine rundere Form annehmen. Ihre Oberfläche vergrößert sich dadurch

um das Zwei- bis Vierfache. Eine Mg^{2+} -abhängige ATPase, die Aminophospholipid-Translokase, die Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin ausschließlich an die Zytosolseite der Membran transportiert, sorgt für eine bemerkenswerte Asymmetrie in der Verteilung der Phospholipide (Dolis *et al.*, 1997). Diese Membranasymmetrie wird durch ein membranständiges Protein namens „*scramblase*“ aufgehoben, indem die Aminophospholipide auf die äußere Membranseite geflippt werden (Zhou *et al.*, 1997).

Die Anheftung von Plättchen an auf endothelialen Zelloberflächen exponiertes Kollagen wird durch von-Willebrand-Faktor (vWF) vermittelt. vWF bildet eine Brücke zwischen einem Glykoproteinkomplex auf der Plättchenoberfläche (GPIb/IX/V) und Kollagenfibrillen. Darüber hinaus bindet vWF FVIII, der nur in Gegenwart von vWF im Blutkreislauf stabil ist (Ruggeri, 2001).

Die Bindung von Thrombin an spezifische Oberflächenrezeptoren auf Thrombozyten führt zu deren Aktivierung über eine Signaltransduktionskaskade. Der Thrombinrezeptor (PAR-1) ist an ein G-Protein gekoppelt, das Phospholipase-C- γ (PLC- γ) aktiviert. PLC- γ spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerin (DAG). DAG aktiviert Proteinkinase C (PKC), und IP_3 induziert die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} , was wiederum zur Aktivierung von Phospholipase A_2 (PLA_2) führt. PLA_2 hydrolysiert Membran-Phospholipide und setzt damit Arachidonsäure frei. Dadurch wird die Produktion von Thromboxan A_2 (TXA_2) stimuliert. Ein weiterer Effekt einer erhöhten Ca^{2+} -Konzentration ist die Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase, die durch Phosphorylierung von Myosin die Plättchen-Morphologie und -Beweglichkeit verändert (Grand *et al.*, 1996).

1.2.2 Intrinsisches System

Die intrinsische Kaskade wird ausgelöst, wenn Präkallikrein (Fletcher-Faktor), FXII (Hageman-Faktor) und FXI sowie dessen mitzirkulierender Kofaktor *high-molecular-weight* (HMW)-Kininogen an exponierte negativ geladene Oberflächen binden (Kontaktaktivierung; Schmaier, 2000). Die Umwandlung von Präkallikrein in Kallikrein führt zur Aktivierung von FXII. FXIIa kann einerseits weiteres Präkallikrein spalten (positive Rückkopplung), jedoch auch FXIa erzeugen (Thompson *et al.*, 1977), was die Freisetzung von Bradykinin (einem gefäßerweiternden Peptid) aus HMW-Kininogen bewirkt. Die weiteren Schritte sind die Aktivierung von FIX und FX. FVIIIa, entstanden aus FVIII in Gegenwart katalytischer Mengen von Thrombin (Saenko *et al.*, 1999), agiert als Rezeptor (Kofaktor) für FIXa und FX. Bei steigender Thrombinkonzentration wird FVIIIa letztlich von Thrombin inaktiviert. Diese zweifache Wirkung von Thrombin auf FVIII(a) limitiert die Bildung des *tenase*-Komplexes und damit die Gerinnung.

1.2.3 Extrinsisches System

Die extrinsische Gerinnungskaskade wird an der verletzten Stelle als Antwort auf den Kontakt von *tissue factor* (Faktor III, TF, Thromboplastin), einem integralen Membran-Glykoprotein (Bach *et al.*, 1981; Broze *et al.*, 1985), mit Blut ausgelöst (Maynard *et al.*, 1975; Maynard *et al.*, 1977). TF ist Kofaktor bei der FVIIa-katalysierten Aktivierung von FX (Nemerson und Bach, 1982). FVIIa, eine durch Thrombin oder FXa aktivierte Vitamin-K-abhängige Serinproteinase, spaltet FX. Der Komplex TF–FVIIa aktiviert jedoch auch weitere FVII-Moleküle (Autoaktivierung; Yamamoto *et al.*, 1992).

Intrinsische und extrinsische Kaskade sind durch die Fähigkeit von FXa, FVII zu aktivie-

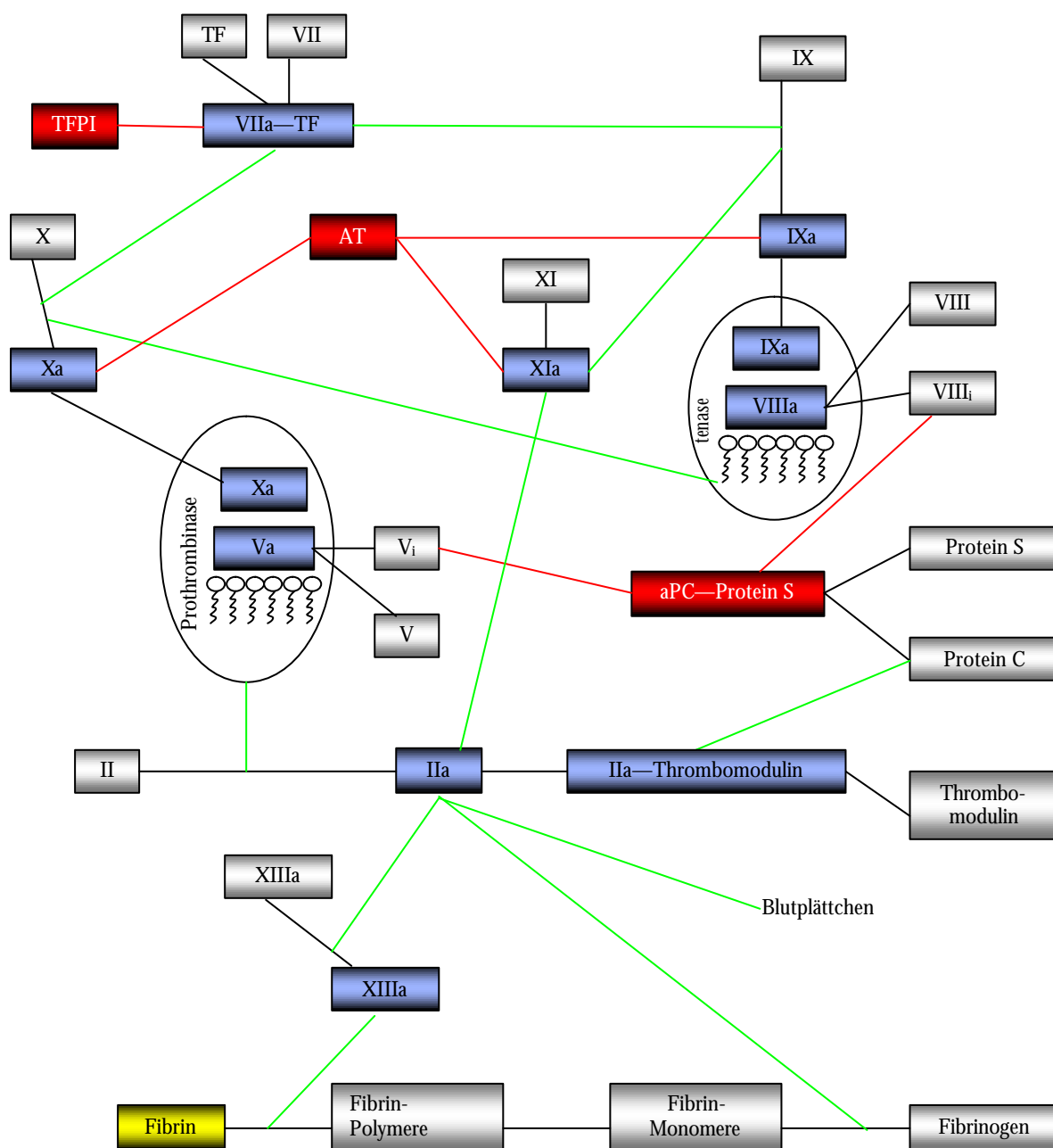


Abbildung 5: Vereinfachtes Schema der Blutgerinnung; gelb: Endprodukt des Wegs, blau: aktivierende Faktoren, rot: inhibierende Faktoren; grüne Pfeile: aktiviert; rote Pfeile: inhibiert; IIa: Thrombin

ren, miteinander verbunden. Des Weiteren ist auch der TF-FVIIa-Komplex in der Lage, FIX zu aktivieren (Bauer, 1997). Die Bildung dieses Komplexes scheint der entscheidende Schritt in der Gerinnung zu sein, da Personen mit erbtem Mangel an Faktoren der Kontaktphase des intrinsischen Weges keine Probleme bei der Blutgerinnung aufweisen.

Ein wichtiger Mechanismus, den Ablauf des extrinsischen Wegs zu beenden, besteht in der Inhibition des Ca^{2+} -abhängigen TF-FVIIa-FXa-Komplexes durch TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*, auch Antikonvertin oder *lipoprotein associated coagulation inhibitor*, LACI), einen Kunitz-Typ-Inhibitor (Broze *et al.*, 1990). Dessen erste Domäne bindet an FXa, während die zweite an FVIIa nur in Gegenwart von FXa bindet.

1.2.4 Gemeinsame Endschritte

Beide Kaskaden münden in die Aktivierung von FX zu FXa. Die Spaltung von FX erfordert das Zusammentreten des calciumabhängigen *tenase*-Komplexes (FVIIIa und FIXa) an Phospholipiden auf der Oberfläche aktivierter Plättchen (Nemerson und Gentry, 1986). FXa wandelt im calciumabhängigen Prothrombinase-Komplex (FVa und FXa) Prothrombin (FII) in Thrombin (FIIa) um (Mann *et al.*, 1990). FVa nimmt in Prothrombinase eine ähnliche Kofaktorrolle ein wie FVIIIa im *tenase*-Komplex. FV wird durch FXa in Gegenwart von Ca^{2+} und Phospholipiden aktiviert (Monkovic und Tracy, 1990) und bei erhöhter Thrombinkonzentration inaktiviert. Thrombin ist in der Lage, seine eigene Produktion durch Aktivierung der Kofaktoren FV (Nesheim und Mann, 1979) und FVIII zu fördern. Thrombin erzeugt schließlich Fibrin aus Fibrinogen (Fgn; Blomback und Blomback, 1972). Die Freisetzung der Fibrinopeptide A und B aus Fgn erzeugt Fibrinmonomere der Untereinheitenstruktur $(\alpha\beta\gamma)_2$, die spontan aggregieren. Der von Thrombin in Gegenwart von Ca^{2+} (Naski *et al.*, 1991) aktivierte Faktor XIIIa ist eine hochspezifische Transglutaminase, die die Amidgruppe von Glutaminen und die ϵ -Aminogruppe von Lysinresten in den Fibrinmonomeren kovalent verknüpft (Folk und Finlayson, 1977). Zuerst werden die γ -Ketten, dann die α -Ketten quervernetzt, was zu einem sehr stabilen Fibringerinnsel führt.

Über diese Aktivität hinaus spielt Thrombin eine wichtige regulatorische Rolle bei der Gerinnung. Komplexe mit Thrombomodulin auf der Oberfläche von Endothelzellen konvertieren zirkulierendes Protein C zu aktiviertem Protein C (aPC) (Esmon und Esmon, 1984; Fuentes-Prior *et al.*, 2000). Thrombin wandelt sich dadurch von einem Procoagulans zu einem Anticoagulans. aPC baut in Gegenwart seines Kofaktors Protein S (Walker, 1980), Phospholipiden und Ca^{2+} FVa (Kisiel *et al.*, 1977) und FVIIIa (Vehar und Davie, 1980) ab, womit es deren Aktivität begrenzt.

Die Aktivität von Thrombin wird auf zwei Weisen kontrolliert. Die Aktivierung von Prothrombin erfordert einerseits die oben beschriebenen Kaskaden von Zymogenaktivierungen, die über Rückkopplungsmechanismen streng kontrolliert werden. Darüber hinaus wird die Thrombin-Aktivität durch drei Thrombininhibitoren, Antithrombin III (AT) (Rosenberg und Damus, 1973), α_2 -Makroglobulin (Gonias, 1992) und Heparin-Kofaktor II (Tollefsen *et al.*, 1982) limitiert. Die Affinität von AT für Thrombin bzw. seine anderen Substrate wird durch die Bindung von Heparin stark erhöht.

1.2.5 Fibrinolyse

Die Serinproteinase Plasmin löst Gerinnsel auf (Booth, 1999). Sie zirkuliert als das Zymogen Plasminogen (Plg) in einer hohen Konzentration von etwa 2 μM , wobei freies Plasmin im Blut sofort von α_2 -Antiplasmin inhibiert wird (Lijnen und Collen, 1985). Plasminogen bindet sowohl an Fgn als auch an Fibrin, wodurch es bei der Bildung eines Klumpens mit integriert wird und damit vor α_2 -Antiplasmin geschützt ist (Collen, 1980).

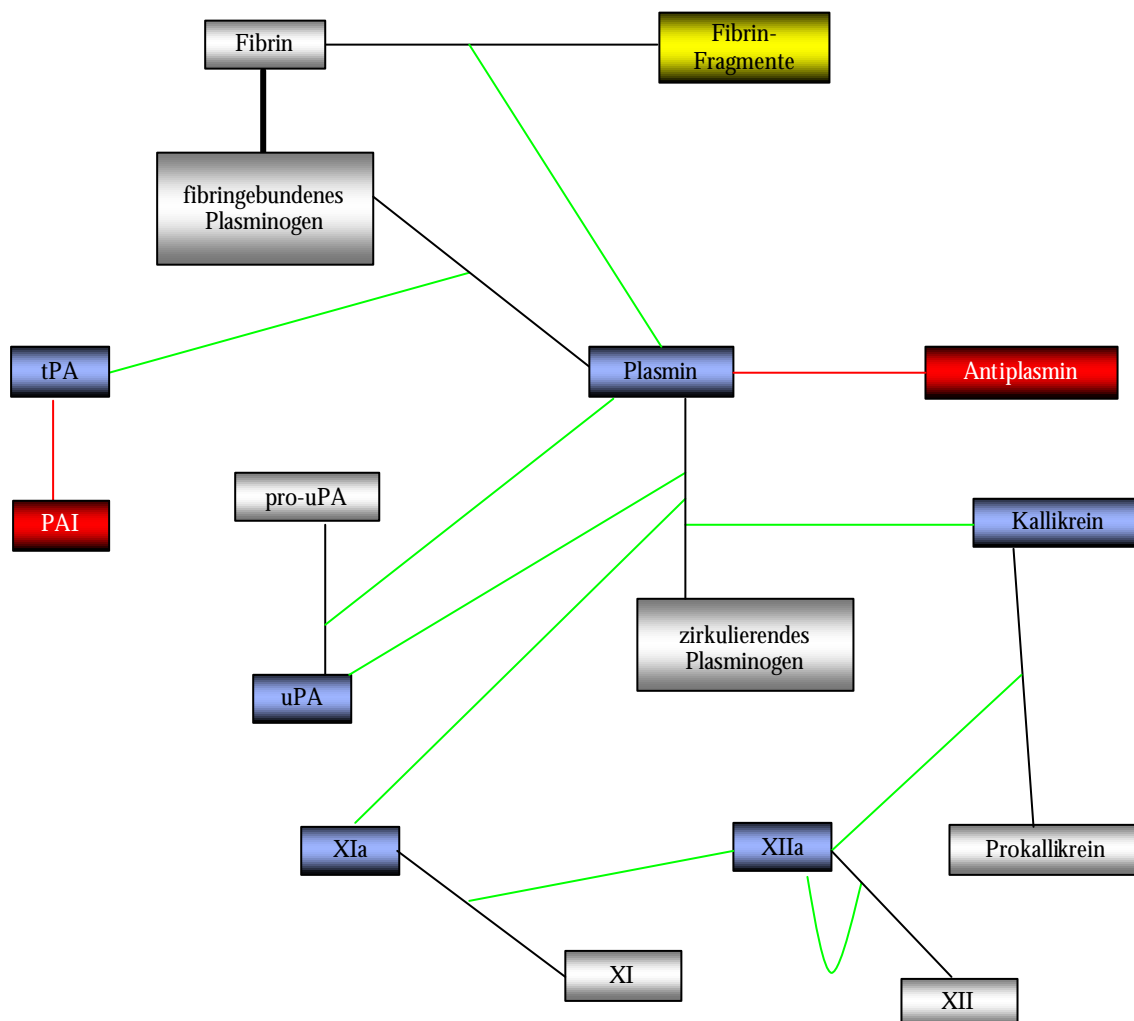


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema der Fibrinolyse; gelb: Endprodukt des Wegs, blau: aktivierende Faktoren, rot: inhibierende Faktoren; grüne Pfeile: aktiviert; rote Pfeile: inhibiert

Die Serinproteinasen tPA (*tissue*-Typ-Plasminogen-Aktivator) und uPA (Urokinase; Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator) aktivieren Plg zu Plasmin. Pro-tPA wird von Gefäßendothelzellen bei einer Verletzung abgegeben, bindet an Fibrin und wird dort aktiviert. tPA ist daher eher für die Aktivierung von fbringebundenem Plg verantwortlich. Der Vorläufer pro-uPA oder *sc*(*single chain*)-uPA wird in Epithelzellen der Ausscheidungsorgane produziert und von Plasmin, Kallikrein und evtl. MT-SP1 aktiviert. uPA und tPA können sich gegenseitig kompensieren. Die Serpine (Serinproteaseinhibitoren) PAI-1, PAI-2 und PAI-3 (Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1, 2 und 3) regulieren die Aktivität der Plasminogen-Aktivatoren (Andreasen *et al.*, 2000). Über tPA und uPA hinaus haben auch FXIIa, Kallikrein und FXIa Plasminogenaktivator-Aktivität (Saito, 1980). Elastase wird bei Entzündungen vermehrt freigesetzt und modifiziert Plg so, daß es ein besseres Substrat für Plasminogenaktivatoren als natives Plg ist. Gleichzeitig inaktiviert Elastase Plasmin- und Plasminogenaktivator-Inhibitoren (Machovich und Owen, 1990).

1.2.6 Gerinnungsstörungen

Mangel an oder völliges Fehlen von verschiedenen Komponenten der Gerinnung führt zwangsläufig zu verschiedenen unter Umständen lebensbedrohlichen Krankheitsbildern. Die fehlende Fähigkeit eines Patienten eine Blutung zu stillen wird Hämophilie genannt. Sie beruht meist auf einer Faktor-VIII-Defizienz (Hämophilie A) (Scheiflinger und Dorner, 1999). Die Manifestierungsstärke von Hämophilie A korreliert mit der Konzentration von FVIIIa im Plasma. Etwa 150 verschiedene Punktmutationen im Gen für FVIII wurden bereits identifiziert. Die Krankheit tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:8000 bei Männern auf. Hämophilie-A-Patienten leiden an Gelenk- und Muskelblutungen, Blutergüssen und verlängerten Blutungszeiten aus Wunden. Zur Behandlung werden FVIII-Infusionen verabreicht (Lee, 1999; Roberts, 1991). Hämophilie B ist dagegen eine Faktor-IX-Defizienz und tritt zehnmal seltener auf als Hämophilie A. Es sind mehr als 300 FIX-Mutationen bekannt, von denen etwa 85% Punktmutationen sind; sie führen zu einer verlängerten Gerinnungszeit (Bajaj, 1999; Roberts, 1993).

Eine Faktor-XIII-Defizienz manifestiert sich in - trotz intakter primärer Hämostase - verzögerter Blutstillung und führt zu subkutanen Hämatomen sowie Gehirnblutungen (Anwar und Miloszewski, 1999). Ein ererbter Mangel an von-Willebrand-Faktor wird von-Willebrand-Krankheit (vWD) genannt, die häufigste ererbte Störung der Hämostase mit etwa 0,8% Betroffenen in der Bevölkerung. vWD verursacht eine gestörte Plättchen-Adhäsion und eine Sekundärdefizienz in Faktor VIII. Die daraus resultierenden Blutungen ähneln denen der Hämophilie (Federici und Mannucci, 2002). Die Defizienz in Antithrombin III (betroffen ist eines von 2000-5000 Individuen) führt zu venösen, selten auch arteriellen Thrombosen nach Operationen, Traumata oder während der Schwangerschaft sowie Lungenembolien. Heparin-Infusionen über

5-7 Tage und nachfolgende gerinnungshemmende Therapie werden zur Behandlung eingesetzt (Vinazzer, 1999). Bei Knochenmarksschäden und Reifungsstörungen der Thrombozyten kommt es zur Thrombozytopenie, einem Mangel an Blutplättchen. In diesem Fall führen kleinste Verletzungen bereits zu Hämatomen und nicht stillbaren Blutungen. Verminderte Blutströmung, etwa bei Krampfadern oder Gefäßwandentzündungen, kann zu einer Thrombose (lokalisierte Gerinnung) führen. Dabei verschließt sich das Blutgefäß und es besteht die Gefahr, daß eine venöse Thrombose eine Embolie im Kreislauf und daraufhin einen Infarkt auslöst (Puyo, 2001). Die Therapiemöglichkeiten bestehen in Behandlung mit fibrinolytischen Enzymen oder Heparin bzw. operativer Entfernung oder Bypass (Überbrückung des Blutgefäßabschnitts; Demetri, 2001).

Cumarinderivate wie Warfarin oder die Glykosaminoglykane, Heparin und Heparansulfat entfalten anticoagulante Wirkung. Heparin bindet und aktiviert Antithrombin III, das dann die Serinproteinasen der Gerinnungskaskade inhibiert. Mastzellen der Gefäße produzieren Heparin, das im Falle einer Verletzung freigesetzt wird. Cumarine hemmen die Gerinnung, indem sie die Vitamin-K-abhängigen γ -Carboxylierungsreaktionen inhibieren, die für die Funktion von Thrombin, Protein C und S sowie der Faktoren FVII, FIX und FX erforderlich sind. Die Reduktion der Chinonderivate von Vitamin K zu ihren aktiven Hydrochinonformen wird durch Cumarine verhindert (Egan *et al.*, 1990).

Die Plasminogenaktivatoren sind ebenfalls hilfreich bei der Kontrolle der Gerinnung. Das für den Fibrinabbau in Gerinnseln hochspezifische tPA („Alteplase“) wird eingesetzt, um die Durchgängigkeit der Koronararterien nach einer Thrombose wiederherzustellen, besonders kurz nach einem Myokardinfarkt (Doggrell, 2001). Streptokinase, ein Plasminogenaktivator aus Streptokokken, ist weniger selektiv als tPA, da es auch zirkulierendes Plasminogen aktivieren kann (Smith, 1999). Folglich führte eine Alteplaseanwendung zu besseren Ergebnissen im Vergleich zur Anwendung von Streptokinase, die eine um 1% höhere Sterblichkeitsrate einen Monat nach dem Infarkt bewirkt.

Aspirin ist ein wichtiger Inhibitor der Thrombozytenaggregation und ein Vasodilatans. Durch die Hemmung von Cyclooxygenase reduziert Aspirin die Thromboxan-A₂-Produktion (Bjorkman, 1998). Ein weiterer Effekt ist die Minderung der Prostacyclin-Synthese in Endothelzellen, was ebenfalls die Plättchenaggregation hemmt und die Gefäße erweitert (Moncada und Vane, 1979).

1.2.7 Die Faktoren der Blutgerinnung

Die Proteinasen der Blutgerinnung gehören zur Familie der (chymo)trypsinartigen Serinproteinasen (S1-Typ). Im Gegensatz zu den Verdauungsenzymen besitzen sie jedoch weitere nichtproteolytische Module, die der Serinproteinasen-Domäne N-terminal vorangehen. Die Ge-

rinnungsfaktoren FVII, FIX und FX sowie Protein C und S gleichen sich darin, daß sie eine Gla-, zwei EGF- und die katalytische Domäne besitzen (Furie und Furie, 1988). In Prothrombin sind die EGF-Module durch zwei *kringle*-Domänen ersetzt. Auch FXII und die fibrinolytischen Enzyme beinhalten *kringle*-Domänen, wie etwa Plasmin (fünf *kringles*), tPA (zwei *kringles*) und uPA (ein *kringle*).

Neun bis zwölf Glutamat-Seitenketten der Gla-Domänen werden von einer Vitamin-K-abhängigen Carboxylase in γ -Carboxyglutamat (Gla) umgewandelt (Furie und Furie, 1997). Daher werden Gerinnungsfaktoren, die Gla-Domänen enthalten, ebenfalls „vitamin-K-abhängig“ genannt. In Abwesenheit von Ca^{2+} sind Gla-Domänen ungeordnet. Bei der Bindung von Calcium werden drei hydrophobe Reste des N-terminalen *loops* exponiert, die für die Membranverankerung verantwortlich zu sein scheinen (Nelsestuen *et al.*, 1978; Falls *et al.*, 2001).

Das EGF-Motiv von 40-50 Aminosäuren, das zuerst in *epidermal growth factor* (EGF) gefunden wurde, kommt in vielen Membran- und Matrixproteinen in bis zu 36 Wiederholungen hintereinander vor. Etwa 25% der EGF-Domänen können Calcium binden (Stenflo *et al.*, 2000). Sie besitzen wenig Sequenzhomologie, aber drei hochkonservierte Disulfidbrücken (Padmanabhan *et al.*, 1993). EGF-Module vermitteln Protein-Protein-Wechselwirkungen, indem sie spezifische Kontaktoberflächen bieten. So interagieren etwa die EGFs von FVIIa und TF miteinander. FIXa bindet über seine zweite EGF-Domäne an Thrombozyten. Reste in EGF-Modulen, die die Kontaktfläche zur katalytischen Domäne bilden, sind stark konserviert (Stenflo, 1999) und können aufgrund von Sequenzähnlichkeiten vorausgesagt werden (Gaboriaud *et al.*, 1998).

Kringle-Domänen von etwa 80 Aminosäuren besitzen ein charakteristisches Faltungsmotiv mit drei Disulfidbrücken, das ihnen die Gestalt eines dänischen Gebäcks verleiht (daher der Name). Sie bestehen aus zwei antiparallelen β -Faltblättern, die aufeinander senkrecht stehen, und enthalten eine Bindestelle für Lysin oder Arginin, die von drei aromatischen Seitenketten umgeben ist (Mathews *et al.*, 1996; Arni *et al.*, 1994). Dadurch entsteht eine stark apolare Umgebung in der relativ flachen Bindestelle.

1.2.7.1 Prothrombin

Prothrombin (EC 3.4.21.5, auch Profibrinogenase, Prothrombase, Faktor II) wird in der Le-



Abbildung 7: Faltung von α -Thrombin (nach Bode *et al.*, 1989)

ber synthetisiert und von dort ins Blut abgegeben. Das dreifach (im menschlichen Protein an N78, N100 und N373) glykosylierte 579-Reste-Protein enthält eine Gla-Domäne (mit zehn γ -Carboxyglutamat-Resten), über die es in Gegenwart von Calcium an die Zellmembran binden kann. Auf die Gla-Domäne folgen, jeweils getrennt durch längere Verbindungssegmente, zwei *kringle*-Domänen und die Serinproteinase-Domäne. Die Prothrombin-Konzentration im Blut

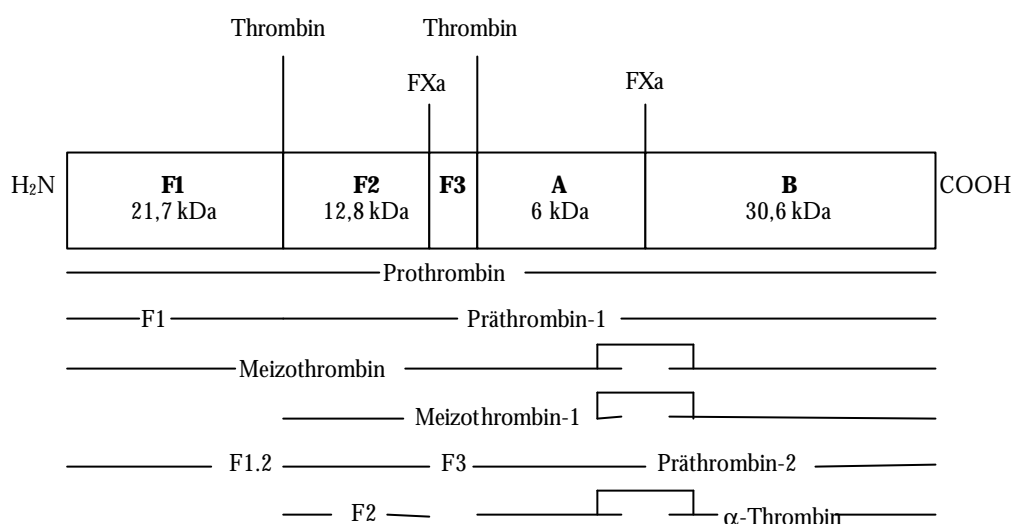


Abbildung 8: Spaltstellen und Intermediate bei der Aktivierung von Prothrombin; oben: aktivierende Proteinasen

beträgt etwa 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Davie, 1995).

Die Aktivierung von Prothrombin erfolgt durch den membrangebundenen Prothrombinase-Komplex (Crook, 1990), der durch das Zusammentreten von FVa, FXa und Ca^{2+} auf der Phospholipidoberfläche aktivierter Thrombozyten entsteht (Tracy *et al.*, 1981). Die Aktivierung von Prothrombin durch FXa alleine ist 300000mal langsamer als im Prothrombinase-Komplex. In Gegenwart von FVa spaltet FXa zuerst die Peptidbindung R320–I321 (entspricht R15–I16 in Chymotrypsinnumerierung), worauf ein instabiles membranständiges Zwischenprodukt namens Meizothrombin entsteht, und dann R271–T272 in Meizothrombin. Neu entstandenes α -Thrombin spaltet daraufhin die Bindung R155–T156

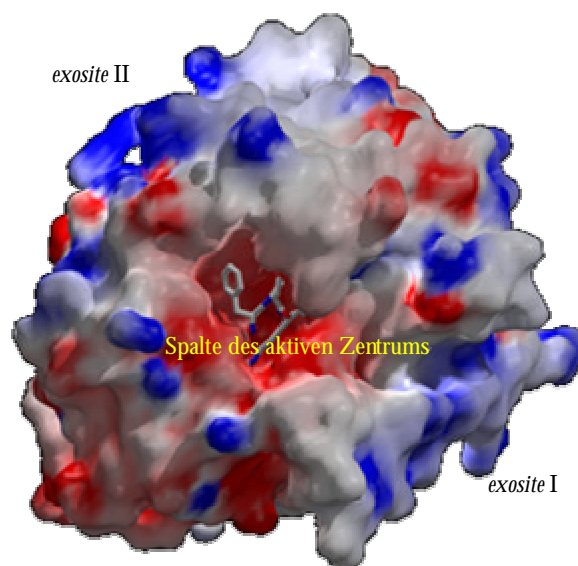


Abbildung 9: Oberflächendarstellung von Thrombin mit Potentialen. Der Inhibitor PPACK ist als Stabmodell dargestellt.

zwischen den *kringle*-Domänen. In Abwesenheit von FVa wird zuerst die R271–T272-Bindung gespalten, was zur Anhäufung der Zwischenprodukte Präthrombin-2 und Fragment 1.2 (F1.2) führt. Bei der Aktivierung wird das Molekulargewicht von 71600 auf 39000 reduziert (Mann *et al.*, 1990).

Eine Besonderheit von Gerinnungs- und Fibrinolyse-Enzymen ist das Vorhandensein von geladenen Oberflächen, die die enzymatischen Eigenschaften der jeweiligen Proteinase durch die Bindung von Liganden mit komplementär geladenen Oberflächen beeinflussen. Die Spezifität von Thrombin wird stark von zwei Stellen auf seiner Oberfläche bestimmt, die eine hohe Anzahl basischer Reste enthalten und deshalb *anion binding exosites* genannt werden (Bode *et al.*, 1992).

Die Bindung an *exosite* I (die sogenannte *fibrinogen recognition exosite*) ist erforderlich für die Erkennung von so verschiedenen Substraten oder Kofaktoren wie Fibrinogen (das hier zusätzlich zum aktiven Zentrum binden muß, um effektiv gespalten zu werden; Fenton *et al.*, 1988; Stubbs *et al.*, 1992) und PAR1 (der Rezeptor für Thrombin auf Thrombozyten; Myles *et al.*, 2001) oder die Bildung von Komplexen mit Serpinen wie Heparin-Cofaktor II (HC II; Rogers *et al.*, 1992). Die C-terminale Sequenz des thrombinspezifischen Inhibitors Hirudin (Hirudin⁵⁴⁻⁶⁵ = Hirugen) bindet ebenfalls an *exosite* I (Rydell *et al.*, 1991). *Exosite* I ist in einer Vorläuferform schon in Prothrombin ausgebildet, deren Affinität zu Bindungspartnern bei der Umwandlung in Thrombin um das etwa 100fache zunimmt (Anderson *et al.*, 2000).

Exosite II ist für die Bindung von Heparin (daher auch *heparin binding exosite*) und anderen Glykosaminoglykanen (Fenton *et al.*, 1989) verantwortlich, aber auch die Erkennung von FVa und FVIIIa findet über sie statt (Esmon und Lollar, 1996). Überraschenderweise zeigte sich, daß auch der Egel-Inhibitor Hämadin an *exosite* II bindet (Richardson *et al.*, 2000). Die Faktoren V, Va und VIII sowie Thrombomodulin und – über chondroitinsulfatenthaltende Zuckerketten – Glykoprotein Ib α interagieren mit beiden *exosites*.

Die Bindung eines Na⁺-Ions an eine spezifische Stelle in Thrombin bewirkt *in vitro* einen Übergang von einer eher anticoagulanten, für PC spezifischen Form (*slow form*) in eine procoagulante, für Fibrinogen spezifische Form (*fast form*, di Cera *et al.*, 1995). Daher wurde ein allosterischer regulatorischer Effekt von Natrium-Ionen auf Thrombin postuliert (Dang *et al.*, 1995), der aber angesichts der konstanten Na⁺-Konzentration von 150 mM im Blut *in vivo* eher irrelevant erscheint.

Viele weitere Funktionen von Thrombin über die Gerinnung hinaus wurden mittlerweile bekannt. Durch die Aktivierung von Progelatinase A in Endothelzellen der Gefäße über aktives Protein C ist Thrombin an der Angiogenese beteiligt (Zucker *et al.*, 1995). *Kringle 2* aus Prothrombin hat eine wachstumshemmende Wirkung. Die Thrombomodulin-mRNA-Expression

von glatten Muskelzellen wird ebenfalls von Thrombin über seinen Rezeptor ausgelöst (Bartha *et al.*, 1993). Thrombin spaltet Thrombopoietin, ein Hormon, das die Thrombozytogenese steuert (Kato *et al.*, 1997), und ist an der Apoptose von Nervenzellen beteiligt (Donovan *et al.*, 1997).

Die Bindung von Substraten oder anderen Liganden an die anionenbindenden *exosites* kann leichte allosterische Konformationsänderungen sowohl im aktiven Zentrum als auch in der anderen *exosite* bewirken (Verhamme *et al.*, 2002), wie etwa bei der Bindung von Hirudin an *exosite* I, durch die sich die Konformation des 149-loops so verändert, daß die limitierte Proteolyse durch Chymotrypsin sechsfach verlangsamt wird (Parry *et al.*, 1993).

1.2.7.2 Fibrinogen

Das primäre Substrat von Thrombin ist Fibrinogen (Fgn, Faktor I). Dieses in der Leber synthetisierte hochmolekulare Glykoprotein (ca. 320-400 kD je nach Organismus) spielt die wichtigste Rolle bei der Zelladhäsion und Gerinnungsbildung. Seine Konzentration im Blut liegt bei 2-4 mg/ml (Davie, 1995). Fgn besteht aus einem Dimer dreier nichtidentischer disulfidverbrückter Ketten (α , β , γ). Kürzlich wurde die Struktur von teilweise verdautem Rinderfibrinogen (4 Å; Brown *et al.*, 2000) sowie von Hühnerfibrinogen (2,7 Å; Yang *et al.*, 2001) veröffentlicht. Die C-terminalen Domänen der α -Ketten (α C, 25-35 kD) sind relativ zum Restmolekül beweglich und beeinträchtigen die Kristallqualität von Rinderfibrinogen, ein Teil davon (die Wiederholungssequenzen; Doolittle *et al.*, 1979) ist aber in Hühnerfibrinogen nicht vorhanden (Weissbach und Griening, 1990), daher vermutlich die bessere Auflösung. Das Molekül ist in einer Ebene sigmoid gebeugt und mißt 460 Å in seiner längsten Ausdehnung (Yang *et al.*, 2001). Die Ebene dieses „S“, die ca. 65 Å breit ist, steht etwa normal zu einer ungefähren zweizähligen Achse. An die kleine zentrale E-Domäne („Disulfid-Knoten“, 33 kD) sind die zwei D-Domänen über tripelhelikale irreguläre *coiled coils* gekoppelt. Alle N-Termini liegen in der E-Domäne, die globulären D-Domänen (67 kD) enthalten die C-Termini.

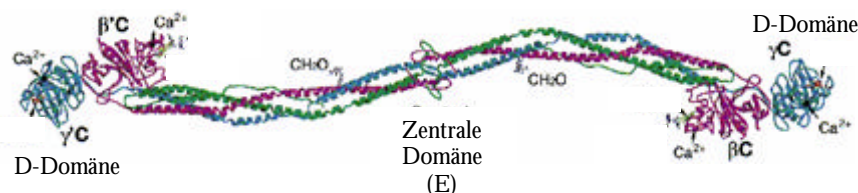


Abbildung 10: Kristallstruktur von Hühnerfibrinogen (2,7 Å; nach Yang *et al.*, 2001)

Die Spaltung nach R16 in der α -Kette und R14 in der β -Kette durch Thrombin (Blomback und Blomback, 1972) führt zur Freisetzung der Fibrinopeptide A und B (Thrombin spaltet nur nach diesen beiden Bindungen, obwohl insgesamt 181 basische Reste in Fgn vorhanden sind).

Dadurch werden Stellen der E-Domäne („*knobs*“) exponiert, woraufhin benachbarte Fibrinmonomere durch Insertion der *knobs* in Bindetaschen der D-Domänen („*holes*“) spontan zu zwei-strängigen Protofibrillen aggregieren.

Die Hauptkontakte finden zwischen der zentralen und der Enddomäne benachbarter Filamente und zwischen den Enddomänen innerhalb desselben Filaments statt. Die Protofibrillen lagern sich seitlich zu dickeren Fasern zusammen. Es bildet sich ein Netzwerk mit regelmäßiger Anordnung; die Gerinnsel werden durch die quervernetzende Einwirkung von FXIIIa weiter verstärkt, bis sie von Plasmin durch Spaltung in den *coiled coils* wieder aufgelöst werden (Doolittle, 1973).

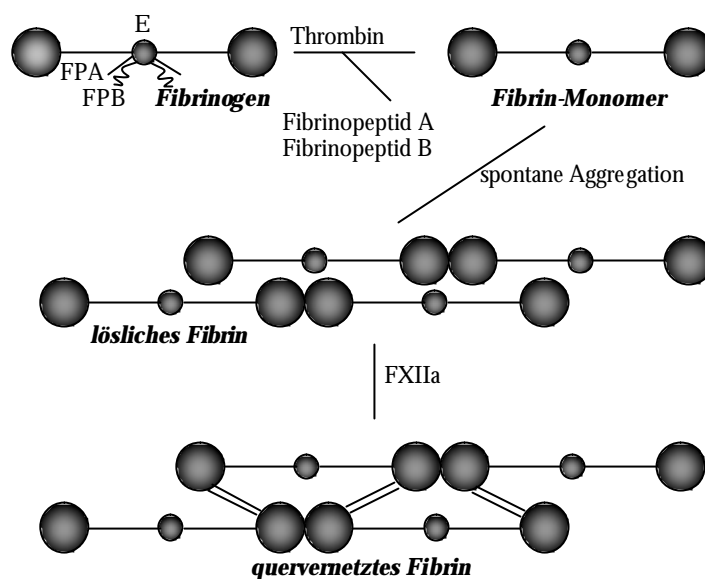


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Bildung von Fibrin aus Fibrinogen; D: D-Domänen; E: E-Domänen; FPA/B: Fibrinopeptid A/B

1.3 Inhibition von Thrombin

Eine große Anzahl von kleinen synthetischen Thrombin-Inhibitoren mit hoher Affinität wurde in den letzten Jahren entworfen, synthetisiert und getestet, um oral aktive Anticoagulantien zu finden (Hauptmann und Stürzebecher, 1999; Steinmetzer *et al.*, 2001). Trotz enormen Aufwands war die Suche nach klinisch verfügbaren Stoffen bislang von eher geringem Erfolg gekrönt. Eine alternative Herangehensweise an dieses Problem ist der Entwurf von rekombinanten oder synthetischen Derivaten natürlicher peptidischer Inhibitoren wie Hirudin, ein 65-Aminosäuren-Peptid aus dem Egel *Hirudo medicinalis* (Markwardt *et al.*, 1967). Hirudin bedient sich einer bivalenten Bindungsweise: Die drei N-terminalen Aminosäuren bilden ein paralleles β -Faltblatt mit den Resten S214–G216 nahe des aktiven Zentrums von Thrombin, gleichzeitig jedoch blockiert der C-terminale Teil von Hirudin die *exosite* I (Rydel *et al.*, 1991). Analog zu PPACK (D β Phe–Pro–Arg–Chloromethylketon) enthielten die ersten bivalenten, von Hirudin abgeleiteten synthetischen Peptidinhibitoren ein N-terminales D β FPR-Segment, das, anders als Hirudin, ein substratähnliches antiparalleles β -Faltblatt im aktiven Zentrum von Thrombin bildet (Maraganore *et al.*, 1990; DiMaio *et al.*, 1990). Um die Spaltung des Inhibitors durch Thrombin zu verlangsamen, mußte die Iminosäure Prolin in der P1'-Position verwendet werden. Völlig stabile

Substanzen konnten aber nur erhalten werden, wenn Peptidbindungsanaloge wie Ketomethylen-
gruppen (DiMaio *et al.*, 1992; Steinmetzer *et al.*, 1999b) oder Übergangszustandsmimetika (Rehse
et al., 1995) eingebaut wurden, deren Synthese aber schwierig und zeitaufwendig sein kann. α -FPR
wurde auch durch von Argatroban (Tsuda *et al.*, 1994) oder NAPAP (Steinmetzer *et al.*, 1999a)
abgeleitete Segmente ersetzt, wobei sich Substanzen ähnlicher Affinität ergaben.

Peptide mit einem Prolin in P1 werden nur von wenigen Proteinasen gespalten
(Cunningham und O'Connor, 1997). Dies führte zu der Hypothese, daß N_{α} -Methyl-Arginin (R^M)
als eine Art kombiniertes „Prolin- und Arginin-Analogon“ fungieren und damit stabile Peptid-
mimetika mit hoher Affinität ermöglichen könnte (Steinmetzer *et al.*, 2000). Die Bindungsweise
eines Inhibitors mit dieser Aminosäure wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

1.4 Bakterielle Zymogenaktivatoren

Bei der Pathogenese bakterieller Infektionen ist Proteolyse eine wichtige Komponente, so-
wohl bei den mit der Infektion verbundenen Gewebeschädigungen als auch bei der Invasion der
Bakterien in sekundäre Infektionsstellen im Körper des Wirts. Dabei kann die proteolytische
Aktivität verschiedene Funktionen haben: Bakterien wie *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus*, *Clostridium*
und *Porphyromonas* produzieren Proteinasen breiter Substratspezifität, die sie zu ihrer Ernährung
nutzen, indem sie entweder Aminosäuren aus Säugergeweben freisetzen oder die Permeabilität
der Gefäße erhöhen. Dadurch wird der Zufluß von Nährstoffen zur Infektionsstelle aufrechter-
halten (Travis *et al.*, 1995; Goguen *et al.*, 1995). Durch Proteolyse kann aber auch eine geeignete
Umgebung für die Vermehrung anaerober Bakterien geschaffen werden. Bakterielle Proteinasen
können gegen zirkulierende Proteine unserer Immunabwehr wie Antikörper und Komplement-
Proteine oder Proteinase-Inhibitoren gerichtet sein oder das Zymogen einer Säugerproteinase,
z.B. Procollagenase, aktivieren. Dies kann zu unkontrollierter proteolytischer Aktivität an der
Infektionsstelle und massiven Gewebeschäden führen, und der Abbau von Gewebestrukturen
durch bakterielle Proteinasen kann die Verbreitung der Bakterien durch Gewebebarrieren för-
dern.

Im Säugerkörper bestehen Gewebebarrieren vorrangig aus extrazellulärer Matrix (EZM)
und Basalmembranen, die von invasiven Bakterien durchbrochen werden müssen, um das Ge-
fäßsystem zu erreichen. Der Abbau von Kollagenen, Elastin und Fibronectin durch bakterielle
Proteinasen führt zu einer massiven Gewebeerstörung bei Krankheiten wie Hornhaut-Keratitis
(*Serratia marcescens* und *Pseudomonas aeruginosa*), Periodontitis (*Porphyromonas gingivalis*), cystischer
Fibrose (*Pseudomonas aeruginosa*) und Wundbrand (*Clostridium perfringens*) (Travis *et al.*, 1995).

Eine Reihe von bakteriellen Pathogenen produziert wenig Proteinase und vor allem keine Kollagenasen. Hierbei handelt es sich um die Verursacher bakterieller Meningitis und die meisten Darmbakterien: *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Escherichia coli*. Einige von ihnen sind intrazelluläre Pathogene, deren Durchtritt durchs Gewebe eine intrazelluläre Phase beinhaltet. Andere invasive Bakterien jedoch sind extrazellulär und müssen sich zur Invasion anderer Mechanismen bedienen. Manche interagieren mit Proteinase-Kaskaden des Wirts wie der Blutgerinnung, Fibrinolyse, Komplementaktivierung, Phagozytose und der Kallikrein-Kinin-Kaskade (Travis *et al.*, 1995; Colman, 1998; Herwald *et al.*, 1998). Bakterien können diese Abläufe aktivieren oder inaktivieren, und zwar direkt über ihre Proteinase oder andere Oberflächen-Komponenten oder indirekt, indem sie die Freisetzung von Proteinase oder deren Zymogenen aus Phagozyten auslösen.

Wegen ihrer hohen Konzentration im Plasma und der weitreichenden und vielfältigen Wirkung ihrer aktivierten Form sind die Serinproteinase-Zymogene Plasminogen (Plg) und Prothrombin (PT) lohnende Ziele für pathogene Bakterien. Dabei können sie Aktivatoren dieser Proenzyme bzw. Rezeptoren dafür exprimieren oder aber die Produktion wirtseigener Aktivatoren oder Inhibitoren anregen.

1.4.1 Plasminogen-Aktivatoren

Bakterielle Plasminogen-Aktivatoren zerfallen in zwei Gruppen: Streptokinase (SK) und Staphylokinase (SAK) sind keine Enzyme, sondern bilden 1:1-Komplexe mit Plg und Plasmin und verändern damit deren Konformation und Spezifität. SK-Plasmin und SAK-Plasmin sind, anders als Plasmin alleine, effiziente Aktivatoren von Plg (Parry *et al.*, 2000). Die Sequenzhomologie von SK und SAK ist gering, aber die Kristallstrukturen zeigen eine ähnliche Faltung (*β -grasp*), wobei SAK und die drei SK-Domänen (α , β und γ) jeweils aus fünf- oder viersträngigen β -Faltblättern und einer zentralen α -Helix oder einem *coiled coil* bestehen (Parry *et al.*, 1998; Rabijns *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Der Aktivierungs-Mechanismus ist prinzipiell ähnlich, unterscheidet sich aber in wichtigen Details wie der Abhängigkeit von Fibrin im humanen Plasma.

Aktivator	MW (kDa)	aus	Charakteristika
Streptokinase	47	Streptokokken aus Gruppe A, C und G	1:1-Komplex mit Plg, der Plg aktiviert
Staphylokinase	16	<i>Staphylococcus aureus</i>	1:1-Komplex mit Plg oder Plasmin. Nur der Komplex mit Plasmin aktiviert Plg. Aktiviert vorrangig fibringebundenes Plg.
Pla	35	<i>Yersinia pestis</i>	membrangebundene Proteinase, die wie tPA und uPA Plg proteolytisch aktiviert
PauA	58	<i>Streptococcus uberis</i>	Mechanismus unbekannt

Das Transmembranprotein Pla aus *Yersinia pestis* dagegen ähnelt in seiner Wirkungsweise den Säuger-Plasminogen-Aktivatoren, indem es Plg wie tPA oder uPA durch Spaltung an der R560-V561-Bindung aktiviert.

1.4.1.1 Streptokinase

SK ist ein 414-Aminosäure-Protein, das von Streptokokken der β -hämolytischen Gruppe A, C und G sezerniert wird und wegen seiner Aktivität als Plg-Aktivator (Castellino *et al.*, 1976) klinische Verwendung als thrombolytisches Agens findet. Es spielt eine Rolle bei der Pathogenese von Post-Streptokokken-Glomerulonephritis (PSGN). Die Sequenzidentität zwischen SKs aus Streptokokken der verschiedenen Gruppen liegt zwischen 80% und 98%. Die variablen Aminosäuren häufen sich in zwei „variablen Regio-

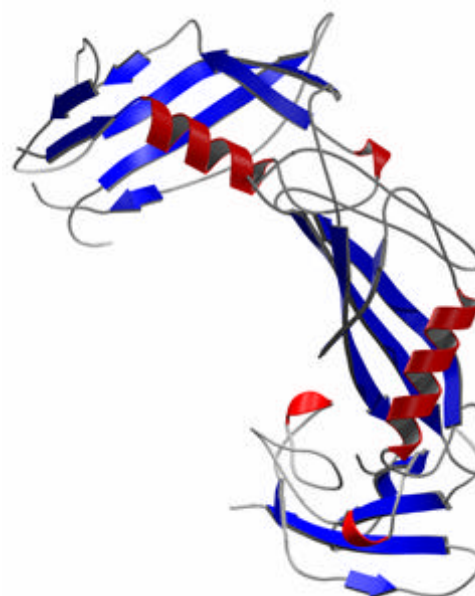


Abbildung 12: Faltung von Streptokinase (nach Wang *et al.*, 1998)

nen“ V1 (147-218) und V2 (244-264) (Malke, 1993; Malke *et al.*, 2000).

Im SK-Plg-Komplex ist das aktive Zentrum von Plg exponiert und auch ohne Spaltung der R560-V561-Bindung funktionsfähig. Lysin verhindert die Komplexbildung nicht und die proteolytische Aktivität kann durch α_2 -Antiplasmin nicht reguliert werden (Cederholm-Williams *et al.*, 1979; Wiman, 1980). Ein zweites Plg-Molekül (das „Substrat-Plg“) bindet an die α -Domäne von SK und wird in diesem ternären Komplex in Plasmin umgewandelt. Lysinanaloga inhibieren die Bindung des Substrat-Plg, was darauf hindeutet, daß die *kringles* daran beteiligt sind (Young *et al.*, 1998). Zur Bildung des SK-Plg-Komplexes sind mindestens die Reste S60-K333 notwendig, für höhere Affinität außerdem A334-K387 (Shi *et al.*, 1994), zur Bindung des Substrat-Plg die Region D41-H48 und D220 (Kim *et al.*, 2000).

Peptide mit der Sequenz des N-Terminus von Trypsin (IV) können Trypsinogen aktivieren (Bode und Huber, 1976). Der konservierte N-Terminus von SK (IA) ähnelt dem der katalytischen Domäne von Plg (VV). Dies führte zu der Hypothese, daß die Insertion dieses Peptids in die Aktivierungstasche von Plg zur Aktivierung führt („molekulare Sexualität“). In der Tat bestätigten spätere Studien mit rekombinanten SK-Varianten, daß das N-terminale Isoleucin von SK eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung von Plg durch Streptokinase spielt (Wang *et al.*, 2000). Deletion von I1 führt zum Verlust der Aktivität von SK (Wang *et al.*, 1999). Die wesentlich höhere Affinität von SK zu Plasmin als zu Plg trägt zur Stabilisierung der aktiven Konformation des Zymogens bei (Boxrud und Bock, 2000; Boxrud *et al.*, 2000). Peptide mit der Sequenz der ersten 10–15 Aminosäuren von SK können die Aktivität von SK²⁻⁴¹⁴ wiederherstellen (Boxrud *et al.*, 2001). Demnach würde der N-Terminus von SK mit der Aktivierungstasche von Plg wechselwirken, um den Übergang in die aktive Konformation auszulösen, welcher wiederum durch die höhere Affinität von SK zur aktiven Konformation stabilisiert würde.

1.4.1.2 Staphylokinase

SAK ist ein 136-Aminosäure-Protein aus *S. aureus*-Stämmen, die einen der drei Prophagen mit dem *sak*-Gen enthalten (Collen, 1998). Sie gehört zu den Staphylokokken-Proteinen, die während der späten exponentiellen Wachstumsphase synthetisiert werden und wird von *agr* (*accessory gene regulator*) reguliert. Einige coagulase-negative Staphylokokken (z.B. *S. lentus* und *S. lugdunensis*) exprimieren entweder β -Hämolyysin oder SAK (Sawicka-

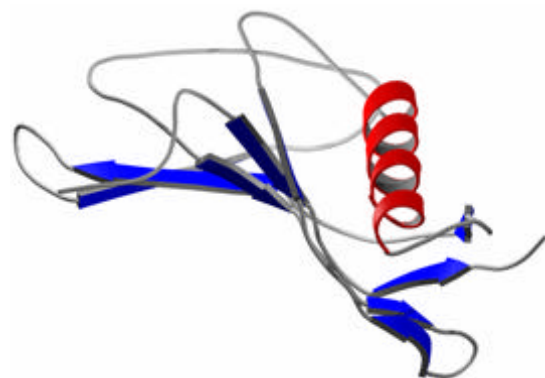


Abbildung 13: Faltung von Staphylokinase (nach Parry *et al.*, 1998)

Grzelak *et al.*, 1993). Die Plg-Aktivierung durch SAK ist relativ komplex und unterscheidet sich vom SK-Mechanismus in entscheidenden Punkten:

- Der SAK-Plg-Komplex ist enzymatisch inaktiv und erfordert die Umwandlung von Plg in Plasmin, um weitere Plg-Moleküle zu aktivieren.
- Der SAK-Plasmin-Komplex wird durch α_2 -Antiplasmin inaktiviert.
- Die Bindung von α_2 -Antiplasmin an den SAK-Plasmin-Komplex zieht die Dissoziation von SAK nach sich. Letztere kann dann mit weiteren Plg- oder Plasmin-Molekülen Komplexe bilden (Lijnen *et al.*, 1994; Schlott *et al.*, 1998; Okada *et al.*, 1996a).
- SAK aktiviert vor allem fibringebundenes Plg (Sakharov *et al.*, 1996).

Nach der spontanen Bildung von Spuren Plasmin aus Plg bildet sich der aktive SAK-Plasmin-Komplex (SAK besitzt eine 160fach höhere Affinität zu Plasmin als zu Plg). Im Komplex wird dann die K10-K11-Peptidbindung von SAK gespalten, woraufhin das modifizierte SAK-Plasmin weitere SAK-Plg-Komplexe in SAK-Plasmin umwandeln kann, welches wiederum freies Plg in Plasmin konvertiert. Die *kringles* des aktivierenden Plg bzw. Plasmin sind an der Wechselwirkung mit SAK nicht beteiligt, und offensichtlich sind R719 und M26 von SAK für die Bindung essentiell (Kim *et al.*, 1997; Lijnen *et al.*, 1994). K11 scheint eine wichtige Rolle zu spielen, da seine Deletion oder Ersetzung durch Cystein zum Verlust der Aktivatorfunktion führt (Jespers *et al.*, 1999). Ähnliches gilt für D13 und D14, während Substitutionen von E46, K50, E65 oder D69 die Affinität von SAK zu Plasmin(ogen) stark verringern (Silence *et al.*, 1995).

Sind die Lysin-Bindestellen von Plasmin durch Bindung des Komplexes an Fibrin oder Fgn-Fragmente besetzt, kann α_2 -Antiplasmin die Bildung des SAK-Plasmin-Komplexes nicht verhindern (Okada *et al.*, 1996b). Daher aktiviert SAK vornehmlich fibringebundenes Plg und könnte als thrombolytisches Agens zur Auflösung von Blutgerinnseln verwendet werden (Collen, 1998).

1.4.1.3 Pla und die OmpT-Familie

Die Oberflächen-Proteinase Pla aus *Yersinia pestis* ist für den invasiven Charakter der Pest verantwortlich (Sodeinde *et al.*, 1992). Pla scheint vor allem für die Verbreitung von *Y. pestis* im Blutkreislauf wichtig zu sein. Das Außenmembran-Protein wird von dem 9,5-kb-Plasmid pPCP1 kodiert, das auch das Bakteriocin Pesticin enthält (Sodeinde und Goguen, 1988). *Escherichia coli* und *Salmonella typhimurium* tragen chromosomale Homologe namens

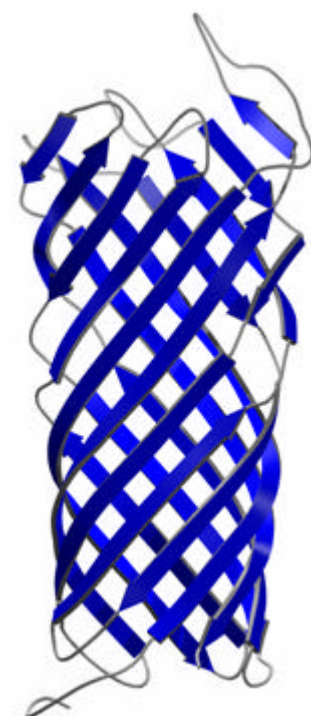


Abbildung 14: Faltung von OmpT (nach Vandeputte-

ompT und *pgtE* (oder Gen *E*), besitzen aber äußerst selten und geringe Plasminogen-Aktivator-Aktivität (Sodeinde und Goguen, 1989; Lundrigan und Webb, 1992). OmpT hat vermutlich andere Funktionen, ist unter stark denaturierenden Bedingungen aktiv und könnte eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Membranproteinen in *E. coli* spielen (White *et al.*, 1995). Die beiden Proteine bilden zusammen mit PgtE sowie SopA aus *Shigella flexneri* die Familie der engverwandten „Omptine“ (Mangel *et al.*, 1994). OmpT und aufgrund von 50% Identität vermutlich auch Pla besteht aus einem membranständigen β -barrel aus zehn β -Faltblättern und fünf Oberflächen-loops (Vandeputte-Rutten *et al.*, 2001). Die letzten drei loops bestimmen die Substratspezifität (Kramer *et al.*, 2001) und unterscheiden sich deshalb auch von den entsprechenden loops in Pla (Kukkonen *et al.*, 2001). Die einzelnen Faltblätter mit durchschnittlich 23 Resten stehen in einem Winkel von etwa 40° zu barrel-Achse. Das barrel ist hohl und innen negativ geladen. Eine große extrazelluläre Spalte mit negativem Potential beinhaltet die Reste des aktiven Zentrums. Die 18 Reste dieser Spalte sind in allen Omptinen konserviert. Mutageneseexperimente haben gezeigt, daß die Substitution der Reste D83, D85, D218 und H212 zu einer 10000fach verminderten Aktivität führt. Diese Reste sind in Paaren (D83/D85 und D210/H212) auf gegenüberliegenden Seiten der Spalte angeordnet. Wahrscheinlich wird ein zwischen D83 und H212 gebundenes Wassermolekül von der H212/D210-Dyade aktiviert, das dann einen nukleophilen Angriff auf die zu spaltende Peptidbindung ausführt.

1.4.1.4 Weitere Plasminogen-Aktivatoren

Streptococcus uberis verursacht bovine Mastitis (eine Euterinfektion) durch PauA, ein 251-Aminosäure-Protein mit niedriger Sequenzhomologie zu SK (Rosey *et al.*, 1999). Kuhmilch enthält Plg, und die Peptide, die von Plasmin aus bovinem Casein freigesetzt werden, stillen den Aminosäurebedarf von *S. uberis* (Kitt und Leigh, 1997). Eine 80-kDa-Proteinase aus *P. gingivalis* aktiviert Plg und mehrere Inhibitoren, was zusammen zu unkontrolliertem Abbau von Periodontalgewebe führen kann (Grenier, 1996).

1.4.2 Staphylocoagulase

1.4.2.1 Struktur und Funktion

Die (Staphylo-)Coagulasen (STCs) sind Proteine aus gewissen Stämmen von *Staphylococcus aureus* mit Molekulargewichten zwischen 54 und 77 kDa und der Fähigkeit, menschliches Plasma gerinnen zu lassen (Kawabata und Iwanaga, 1994; Morita *et al.*, 1982; Kawabata *et al.*, 1985a). Sie bilden mit Prothrombin einen aktiven 1:1-Komplex (auch Staphylothrombin genannt, $K_D=460$ pM), der unter Umgehung der physiologischen Gerinnungskaskade Fibrinogen spalten und damit Fibrin bilden kann. Dafür ist, im Gegensatz zum normalen Aktivierungsmechanismus, keine pro-

teolytische Spaltung von Prothrombin erforderlich. Die Sequenzen von STCs aus verschiedenen Stämmen zeigen eine hohe Homologie, unterscheiden sich aber in der Länge der C-terminalen Region (Kaida *et al.*, 1987; Kanemitsu *et al.*, 2001). STC enthält keine Cystein-Reste, Kohlenhydrate oder posttranslationale Modifikationen und renaturiert spontan aus *inclusion bodies* (Kaida *et al.*, 1987). Die Primärstruktur beinhaltet einen IV-N-Terminus und acht C-terminale sich wiederholende Tandemregionen von je 27 Aminosäuren. Das durch chymotryptische Spaltung erhaltene Fragment STC¹⁻³²⁴ hat bei der Bindung und Aktivierung von Präthrombin-1 und bei der Fgn-Spaltung praktisch identische Eigenschaften wie das Vollängenprotein (Kawabata *et al.*, 1986). Auch ein rekombinant erzeugtes Fragment STC¹⁻³²⁷ ist in seinem Verhalten vom Vollängenprotein und vom STC¹⁻³²⁴-Fragment ununterscheidbar.

Das einzige andere Beispiel nichtproteolytischer Zymogenaktivierung ist das von Streptokinase (Wang *et al.*, 2000). Zwischen SK und STC besteht keine erkennbare Sequenzhomologie. Auch bei Coagulasen ist der N-Terminus strikt konserviert (IV), was auf einen Mechanismus unter Beteiligung molekularer Sexualität hindeutet. STC besitzt eine wesentlich höhere Affinität zu α -Thrombin als zu Prothrombin (Paul Bock, persönliche Mitteilung), was darauf hindeutet, daß auch hier die aktive Konformation stabilisiert wird.

Komplexe verschiedener Thrombinformen mit STC unterscheiden sich in ihrer Substratspezifität wesentlich von freiem Thrombin oder anderen Thrombinkomplexen. STC-Komplexe aktivieren FV und FVIII nicht und werden von Antithrombin-Heparin nicht und von Hirudin nur schwach inaktiviert (Kawabata und Iwanaga, 1994). STC bildet keine Komplexe mit FX, FIX, Protein C, Protein S oder Protein Z (Kawabata *et al.*, 1985a), der STC-Prothrombin-Komplex kann jedoch schwach FXIII aktivieren (Soulier, 1967). Die Aktivität von Staphylothrombin bei der Spaltung von Fgn beträgt (je nach Studie) 12-90% (Kawabata *et al.*, 1985b) der Aktivität von freiem Thrombin.

1.4.2.2 Klinische Relevanz

Infektiöse Endokarditis und die Aktivierung des Gerinnungssystems bei Sepsis werden durch dasselbe Ereignis ausgelöst: einen endothelialen Zellschaden, der zur Aktivierung der Gerinnungskaskade durch TF, Thrombozyten-Aktivierung und -Aggregation führt (Karchmer, 1985; Kaye, 1985). Bei Endokarditis betrifft diese Schädigung normalerweise die Oberflächen von Herzklappen in Bereichen sehr schnellen Blutflusses und ist das erste

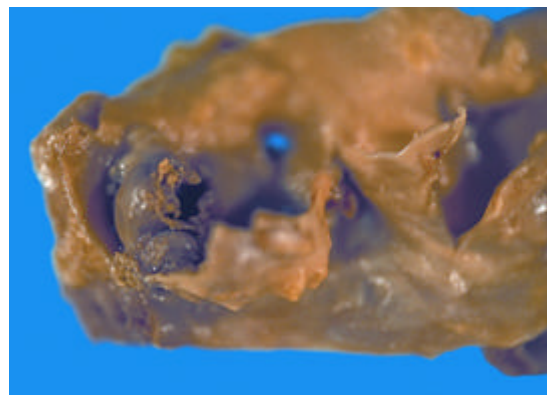


Abbildung 15: Bakterielle Endokarditis. Aus: Lanz C, Zimmer G, Kehtari R (1999) Fulminante Sepsis bei akuter bakterieller Endokarditis. Schweiz. Med. Wochenschr. **129**, 1117

Ereignis der Krankheit. Diese nichtbakteriellen thrombotischen Läsionen bestehen aus einem Gerinnsel aggregierter Plättchen und Fibrin. Bei Sepsis stimulieren Faktoren aus den infizierenden Bakterien entzündungsfördernde Moleküle, was zu einer Sekundärschädigung des Endothels führt (Esmon, 2001; Levi *et al.*, 2000). Durch die Gerinnungskaskade entstehendes Thrombin und die Hemmung der antikoagulanten Wege führen zu verstreuter intravaskulärer Gerinnung. Endokarditis wird durch zirkulierende pathogene Bakterien initiiert, die sich an das Thrombozyten-Fibrin-Gerinnsel am geschädigten Endothel anheften. Die Adhäsion erfolgt durch fibronectin- und fibrinogenbindende *clumping*-Faktoren auf der Bakterienoberfläche (Kaye, 1985). STC-exprimierende *S. aureus*-Stämme sind eines der häufigsten Pathogene bei akuter infektiöser Endokarditis, die 20-35% aller Fälle nativer Klappenendokarditis ausmacht (Karchmer, 1985). Die Erkrankung schreitet fort mit zusätzlicher Fibrinbildung und Aggregation von Plättchen, Fibrin und Bakterien zu Vegetationen auf der Herzklappe. Obwohl Tiermodelle zeigen, daß eine Beteiligung von STC an der Adhäsion eher unwahrscheinlich ist (Moreillon *et al.*, 1995; McDevitt *et al.*, 1992), erfordert die folgende Verbreitungsphase der Endokarditis und das Vegetationswachstum eine Fibrinneubildung, die durch STC-(Pro)Thrombin-Komplexe katalysiert wird. Große Vegetationen bröckeln ab, was zur Bildung von Emboli führt, die Abszesse fernab der ursprünglichen Läsion und auch Schlaganfälle und Myokardinfarkte verursachen können. Ohne Behandlung ist Endokarditis zu 100% tödlich, und Herzversagen verbunden mit Herzklappen-Dysfunktion ist die Haupttodesursache. Antibiotika-Therapie erhöht die Überlebensrate deutlich, die Rest-Mortalität liegt aber immer noch bei 25-40% (STC-positive *S. aureus*, Korzeniowski und Kaye, 1992). Die Erkenntnis der Rolle der Blutgerinnung bei Sepsis führte zur Entdeckung vielversprechender neuer Therapieansätze mit Antithrombin und Heparin (Levi *et al.*, 2001; Lynn und Cohen, 1995), vor allem aber mit aktiviertem Protein C (aPC). aPC wirkt als Anticoagulans, indem es die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa inaktiviert, und besitzt antiinflammatorische Aktivität (Bernard *et al.*, 2001). Die Sterblichkeit von Patienten mit schwerer Sepsis kann durch aPC-Gabe reduziert werden. Durch die Präsenz von STC bei coagulase-positiven *S. aureus*-Infektionen wird die Ansprechbarkeit von Endokarditis durch antithrombotische Therapie stark eingeschränkt. Durch die Bildung der STC-(Pro)Thrombin-Komplexe und die Prothrombin-Aktivierung direkt in der Vegetation wird Fibrin unter Umgehung der normalen Prothrombin-Aktivierungskaskade gebildet. Durch die Blockierung von (Pro)*exosite* I in (Pro)Thrombin, die für die effektive Erkennung von Fgn zugänglich sein muß, ist eine normale anticoagulante Therapie nicht mehr möglich. Eine neue Therapie, die auf der Inhibierung der durch STC aktivierten Blutgerinnung basiert, könnte zur Überwindung der Antibiotikaresistenz vieler *S. aureus*-Stämme beitragen.

1.5 Proteinasen im Krebsgeschehen

Die Hauptursache für den Tod von Krebspatienten ist die Verbreitung von malignen Zellen auf andere Organe (Metastase). Obwohl Mutationen in den Haupt-Wachstumskontrollgenen (Onkogenen oder Tumor-Suppressor-Genen) zur Umwandlung der Zellen beitragen, verändert sich auch die Expression von normalen Genen im Verlauf der Metastasierung. Die Tumorprogression ist ein schrittweiser Prozeß: Mehrere Veränderungen in einer normalen Zelle können zu einem lokal begrenzten, aber letztendlich auch zu einem invasiven und metastasierenden Tumor führen. Die Tumorzellinvasion erfordert die Anheftung von Tumorzellen an die Basalmembran, lokale Proteolyse und die Wanderung von Tumorzellen durch die proteolytisch veränderte Region (Liotta, 1992). Die lokale Proteolyse wird von an die Zelloberfläche gebundenen oder von der Tumorzelle freigesetzten Proteinase außerhalb der Tumorzelle durchgeführt. Auch Proteinase innerhalb der Zelle sind durch die Verdauung phagozytierter extrazellulärer Matrix beteiligt. Um zu metastasieren muß eine Zelle in das Gefäßsystem eindringen können (Intravasation), im Blutkreislauf überleben, das Gefäßsystem wieder verlassen (Extravasation), in das umliegende Gewebe eindringen (Invasion) und dort wachsen. Alle diese Prozesse erfordern Wechselwirkungen zwischen den Tumorzellen, Stromazellen, Endothelzellen und der extrazellulären Matrix. In diesen Zellen exprimierte Proteinase spielen eine wichtige Rolle dabei (Chambers und Matrisian, 1997; Noel *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1998). Es besteht ein klarer Zusammenhang zwischen schlechten Patientenprognosen und hohen Konzentrationen dieser Enzyme, ihrer Rezeptoren und Inhibitoren im Tumorgewebe (Andreasen *et al.*, 1997; Kute *et al.*, 1998; Chenard *et al.*, 1996). Es sind Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinase beteiligt, die übergreifende Funktionen ausüben: Kathepsin D etwa kann Kathepsin B aktivieren, welches wiederum extrazelluläre Kollagenase direkt reguliert oder pro-uPA aktiviert, was zur Plasmin-Erzeugung führt. Plasmin jedoch ist ein Aktivator der meisten pro-MMPs. Dies zeigt, daß mehrere Proteinase in einem Tumor gleichzeitig aktiv sein und sogar eine Kaskade bilden können. Es könnte auch funktionelle Überlappungen geben, da Mäuse mit einem Mangel an einzelnen Proteinase keinen Phänotyp zeigen (Carmeliet *et al.*, 1994).

1.5.1 Serinproteinase

Zusätzlich zu seiner fibrinolytischen Funktion (s. o.) bei der Auflösung von Blutgerinnseln scheint Plasmin noch weitere Funktionen zu besitzen. Es ist in der Lage, Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin und den Proteinteil von Proteoglykanen abzubauen. Es spaltet keine fibrillären Kollagene oder Elastin, aber Gelatine (Andreasen *et al.*, 2000). Von den beiden Plasminogen-Aktivatoren scheint tPA mehr an der Thrombolysen, uPA jedoch vor-

nehmlich am Abbau der EZM beteiligt zu sein (Conese und Blasi, 1995). Plasminogen-Aktivatoren werden als Zymogene synthetisiert; für ihre Aktivierung sind mehrere Proteinasen verantwortlich, wie MT-SP1 (Takeuchi *et al.*, 2000), Plasmin, Kathepsin D und weitere (Andreasen *et al.*, 1997). Ihre Aktivität wird durch die Serpine PAI-1, -2 und -3 kontrolliert. Manche Zellen binden sekretiertes uPA über einen spezifischen Zelloberflächenrezeptor (uPA-Rezeptor, uPAR). uPAR ist ein membranständiges uPA-Bindeprotein, das die Plasminogenaktivierung auf die Zelloberfläche fokussiert. Bei Bindung von PAI an den uPAR/uPA-Komplex wird die enzymatische Aktivität inhibiert, der trimolekulare Komplex internalisiert und uPA abgebaut (Schmitt *et al.*, 1995).

Wie bereits erwähnt, gibt es gewisse Überlappungen zwischen den Substratspezifitäten von MMPs und Serinproteinasen. Sie können sich jedoch auch durch ihre Wirkung ergänzen, indem z.B. das Plasmin-System Glykoproteine abbaut, die Kollagenfasern besiedeln, und dadurch die Fasern selbst für MMPs zugänglicher macht (Montgomery *et al.*, 1993). Die Hauptzusammenarbeit findet jedoch auf der Ebene der Aktivierung statt, wobei etwa die subtilisinartige Serinproteinasen Furin MT1-MMP aktiviert (Maquoi *et al.*, 1998). Mehrere trypsinartige Serinproteinasen (Plasmin, Kallikrein, Kathepsin G u.a.) aktivieren pro-Stromelysin-1 *in vitro*. Plasmin ist *in vivo* ein Aktivator zumindest von pro-Stromelysin-1, pro-Gelatinase B, pro-Makrophagen-Elastase und pro-Kollagenase-3. MMPs können wiederum die Serinproteinasen-Aktivität regeln, indem sie deren Inhibitoren abbauen, wie im Falle von Matrilysin oder Makrophagen-Elastase, die das Serpin α_1 -PI degradieren können (Zhang *et al.*, 1994).

1.5.2 Typ-II-Transmembran-Serinproteinasen (TTSPs)

Die Teilnahme von Serinproteinasen an der Zelloberflächenproteolyse überrascht etwas, da bislang angenommen worden war, daß diese Enzyme entweder sekretiert oder in zytoplasmatischen Speicherorganellen ihre signalgesteuerte Freisetzung erwarten würden. In den letzten Jahren gab es jedoch ein explosionsartiges Aufkommen von Membranproteinen mit einer C-terminalen Serinproteinasedomäne. Durch diese Verankerung sind sie ideal positioniert, um mit anderen Proteinen auf der Zelloberfläche, aber auch löslichen Proteinen, Matrixkomponenten und Proteinen auf benachbarten Zellen zu interagieren. Die Zelloberflächenlokalisierung wurde für Enterokinase (Kitamoto *et al.*, 1994), Hepsin (Kazama *et al.*, 1995), MT-SP1 (Takeuchi *et al.*, 2000), TMPRSS2 (Jacquinet *et al.*, 2000) und TMPRSS3 (Wallrapp *et al.*, 2000) experimentell nachgewiesen. Eine N-terminale zytoplasmatische Domäne legt eine Beteiligung an Signaltransduktionskaskaden nahe (Hooper *et al.*, 2001).

Die Familie der Typ-II-Transmembran-Serinproteinasen (TTSPs) besteht mittlerweile aus mehr als 20 Mitgliedern, es werden jedoch laufend weitere gefunden. Wegen seiner zentralen

Rolle in der Prozessierung von Verdauungsenzymen wurde der erste Vertreter dieser Gruppe, Enterokinase (Enteropeptidase), bereits vor einem Jahrhundert gefunden (Kitamoto *et al.*, 1995).

Alle TTSPs besitzen vier gemeinsame strukturelle Merkmale:

- eine kurze zytoplasmatische Domäne,
- eine Transmembran-Region,
- eine Stammregion unterschiedlicher Länge und
- eine chymotrypsinartige Serinproteinasedomäne.

Die zytoplasmatischen Domänen der TTSPs könnten Interaktionen mit Zytoskelettkomponenten oder Signalmolekülen vermitteln. Einige von ihnen besitzen *consensus*-Phosphorylierungsstellen für Proteinkinase C oder Caseinkinase II. Die N-terminale Transmembran-Domäne liegt so, daß sich die katalytische Domäne auf der Zelloberfläche befindet, wodurch die proteolytische Aktivität in die Nähe von Zielproteinen gebracht wird. Beide Domänen könnten wie bei anderen integralen Membranproteinen (Keller und Simons, 1997) zur Zielsteuerung der TTSPs zu einem speziellen Teil der Zelloberfläche beitragen.

Mindestens elf verschiedene Module, die als Regulator- oder Bindedomänen dienen, bilden den Stammbereich der TTSPs. Hepsin ist die einzige TTSP, die kein Stammregionmodul besitzt. Die Funktion dieser Domänen ist völlig unbekannt, vielleicht mit Ausnahme von Enterokinase, deren Stammregion eine Art *Exosite* zur Erkennung von Trypsinogen enthält (Lu *et al.*, 1997). Die am häufigsten vorkommende Domäne ist die LDL-Rezeptor-Klasse-A-Domäne (LDLR). Ihre Fähigkeit Calcium zu binden wurde in anderen Proteinen nachgewiesen, könnte also auch hier eine Funktion darstellen. LDLRs vermitteln die Internalisierung von Makromolekülen wie Proteinase-Inhibitor-Komplexen oder Lipoproteinen und LDLs (*low density lipoproteins*) (Nykjaer *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 1997). Die Präsenz eines konservierten RGD-Motivs (Hynes, 1992) in der ersten CUB-Domäne von MT-SP1 legt die Vermutung nahe, daß die CUB-Domänen an der Bindung von Integrinen beteiligt sind.

Die katalytischen Domänen der TTSPs sind untereinander durch hohe Sequenzhomologie miteinander verwandt. Alle besitzen die Chymotrypsin-(S1-)Faltung und eine katalytische Triade. Die Aktivierung erfolgt durch Spaltung einer Peptidbindung unmittelbar vor dem Beginn der katalytischen Domäne. Wegen der konservierten Disulfidbrücken C1–C122 bleiben die Serinproteinasedomänen jedoch über die Stammregion mit der Membran assoziiert. Da jedoch auch freie Formen gefunden wurden (von Enterokinase, HAT und MT-SP1) (Fonseca und Light, 1983; Lin *et al.*, 1999b), könnten die extrazellulären Domänen auch von der Zelloberfläche abgeschert werden („*shedding*“). Alle bisher beschriebenen TTSPs besitzen einen Aspartatrest in der Position 189, womit sie eine gemeinsame Spezifität für basische P1-Reste zu besitzen scheinen. Die bevorzugte

Spaltsequenz einiger TTSPs wie Hepsin (Vu *et al.*, 1997) und MT-SP1 (Takeuchi *et al.*, 1999) deutet auf autokatalytische Aktivität hin.

Die genauen Funktionen der einzelnen TTSPs sind (mit Ausnahme von Enterokinase, einem wichtigen Verdauungsenzym mit einzigartiger Substratspezifität) weiter ungeklärt. Die meisten Vertreter wurden jedoch mit Tumorzellen und/oder Zellwachstum in Verbindung gebracht. Die TTSPs könnten eine Schlüsselrolle bei Signalübertragungen an der Plasmamembran spielen, wie bereits bekannt von anderen Systemen wie dem der ADAMs (Stone *et al.*, 1999), der MT-MMPs (Seiki, 1999) oder des uPA–uPA-Rezeptor-Systems (Koshelnick *et al.*, 1997). Wie diese könnten TTSPs an proteolytischen Aktivitäten bei der lokalisierten Aktivierung von Wachstumsfaktoren und Umbauprozessen der extrazellulären Matrix beteiligt sein.

1.5.3 MT-SP1

MT-SP1 (auch Matriptase, TADG-15, *suppressor of tumorigenicity 14*; EC 3.4.21) wurde zuerst als eine von humanen Brustkrebszellen exprimierte Proteinase isoliert (Shi *et al.*, 1993). Ursprünglich wurde sie für eine neue Gelatinase gehalten, da sie bei einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa gelatinolytische Eigenschaften besitzt. Die Isolierung und Sequenzierung enthüllte jedoch eine Proteinase mit 683 Resten und einer Serinproteinasedomäne. Um ihre Eigenschaft als matrixabbauendes Protein und ihre trypsinartige Spezifität zu betonen, wurde der leider irreführende (auf eine besondere Ähnlichkeit mit Trypsin schließen lassende) Name „Matriptase“ geprägt (Lin *et al.*, 1999b). Zur selben Zeit wurde von einer anderen Gruppe eine membranständige trypsinartige Serinproteinase aus einer menschlichen Prostata-Karzinom-Zelllinie kloniert, charakterisiert und als Membran-Typ-Serinproteinase 1 (MT-SP1, analog zu „MT-MMP“) bezeichnet

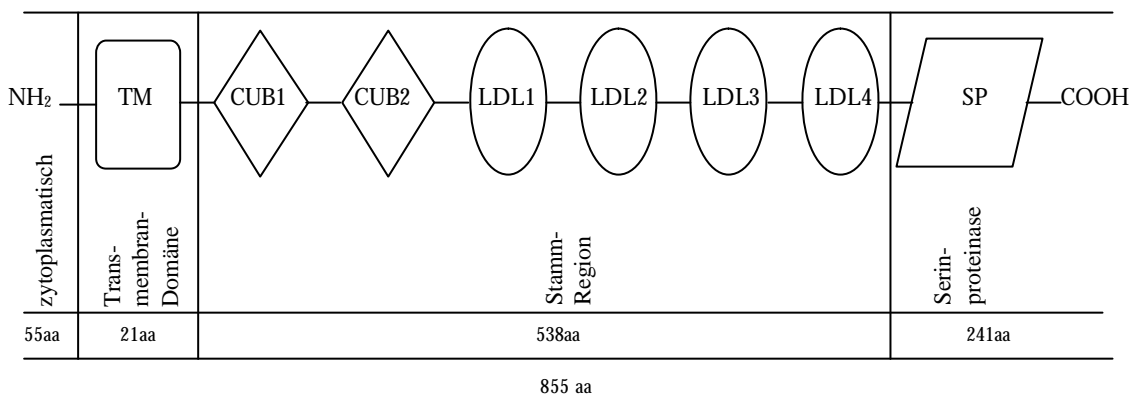


Abbildung 16: Domänenstruktur von MT-SP1; TM: Transmembran-Domäne; CUB: CUB-Domäne; LDL: LDL-Rezeptor-Domäne; SP: katalytische Domäne

(Takeuchi *et al.*, 1999). Dieses 855-Reste-Protein enthielt zwei CUB- und vier LDLR-Wiederholungen zwischen der N-terminalen Transmembran- und der C-terminalen Serinproteinasedomäne. Es stellte sich heraus, daß Matriptase ein löslicher Teil von MT-SP1 ist, entstanden durch Ektodomänen-*shedding* oder alternatives Spleißen (Benaud *et al.*, 2001). MT-SP1 besitzt vier potentielle N-Glykosylierungsstellen (Takeuchi *et al.*, 1999) und ist ein Substrat für UDP-GlcNAc- α -Mannosid- β 1-6-N-Acetylglucosaminyltransferase (GnT-V) (Ihara *et al.*, 2002). MT-SP1-*knockout*-Mäuse wachsen sich zwar zunächst, sterben aber innerhalb von 48 Stunden und zeigen starke Fehlentwicklungen der Epidermis, der Haarfollikel und des Immunsystems (List *et al.*, 2002). MT-SP1 wird in Prostata-, Brust- und Kolorektalkarzinomen *in vitro* und *in vivo* stark exprimiert (Oberst *et al.*, 2001), und seine Hemmung unterdrückt sowohl das Primärtumorwachstum als auch Metastasierung in einem Rattenmodell von Prostatakrebs. Von 43 Ovarialkarzinomen waren 39 (72%) MT-SP1-positiv (Oberst *et al.*, 2002). Das Maus-Homologe heißt Epithin (Kim *et al.*, 1999).

Die Aktivität von MT-SP1 wird auf Epithelzelloberflächen durch nanomolare Konzentrationen an Sphingosin-1-Phosphat (S1P) in Abhängigkeit von Ca^{2+} reguliert (Benaud *et al.*, 2002). Obwohl humane Brustkrebszellen MT-SP1 hauptsächlich als freies Enzym produzieren, findet man es in menschlicher Milch und gesundem Gewebe in Komplex mit einem Inhibitor namens HGF-Aktivator-Inhibitor 1 (HAI-1) (Lin *et al.*, 1999a). Dieser membranständige Inhibitor wurde ursprünglich als Glykoprotein mit 478 Aminosäuren und zwei durch eine LDLR-Domäne getrennten Kunitz-Typ-Domänen, die von einer C-terminalen Transmembrandomäne gefolgt werden, in humanen Magenkrebszellen gefunden (Shimomura *et al.*, 1997), später jedoch auch in anderen Geweben. Es existieren auch lösliche Formen von HAI-1, die durch proteolytische Spaltung entstanden sein dürften (Shimomura *et al.*, 1999). Die erste Kunitz-Domäne besitzt eine weitaus größere inhibitorische Aktivität gegen HGF-Aktivator als die zweite (Denda *et al.*, 2002), wie vermutlich auch der Fall bei MT-SP1. Von 11 getesteten HAI-1-positiven Ovarialkarzinomen waren alle MT-SP1-positiv (Oberst *et al.*, 2002), jedoch waren nur 20% aller getesteten Tumore HAI-1-positiv. Es scheint daher gegenwärtig, daß ein Ungleichgewicht im MT-SP1–HAI-1-Verhältnis zu einer Erhöhung der proteolytischen Aktivität und damit zu einem invasiveren Phänotyp des Tumors führt.

Die Spezifität von MT-SP1 unterscheidet sich grundsätzlich von Trypsin, da MT-SP1 nicht unterschiedslos Peptidsubstrate nach zugänglichen Lysin- oder Argininresten spaltet, sondern zusätzliche Aminosäuren rund um die zu spaltende Peptidbindung erkennen muß. Dies läßt darauf schließen, daß MT-SP1 eine spezifische Proteinase ist, die eine regulatorische Rolle spielen könnte (Takeuchi *et al.*, 1999). Die Substratspezifität von MT-SP1 wurde mithilfe einer *positional scanning synthetic combinatorial library* und *substrate phage display* untersucht (Takeuchi *et al.*, 2000). Die bevorzugten Sequenzen um die Spaltstelle sind demnach Arg oder Lys in P4, basische Reste oder Gln in P3, kleine Seitenketten in P2, Arg oder Lys in P1 und Ala und P1'. Dies stimmt bemerkenswert gut überein mit den Spaltstellen von bekannten Proteinsubstraten von MT-SP1 wie des proteinaseaktivierten Rezeptors 2 (PAR-2; mit der Spaltstelle SKGR), von pro-uPA (PRFK), pro-MT-SP1 (RQAR) und hepatocyte growth (oder scattering) factor (HGF; KQGR). Alle diese Substrate werden *in vitro* und/oder *in vivo* von MT-SP1 aktiviert (Takeuchi *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000). Dagegen werden Zymogene nicht aktiviert, die wie Plasminogen, PAR-1, PAR-3 und PAR-4 eine diesen Kriterien nicht entsprechende Sequenz besitzen.

Da MT-SP1 kolokalisiert mit pro-uPA gefunden wurde (Takeuchi *et al.*, 2000), könnte es ein physiologisch relevanter Aktivator dieses Zymogens und dadurch an durch uPA ausgelösten Prozessen in Angiogenese und Tumordinvasion (Andreasen *et al.*, 2000) beteiligt sein. Darüber hinaus kann MT-SP1 HGF direkt aktivieren, ein ebenfalls an Zellwachstum und Angiogenese

beteiligtes Protein. Aus diesem Grunde könnte MT-SP1 direkte und indirekte Rollen in Zellwachstum und -migration und, bei mangelnder Regulation, auch bei Angiogenese, Tumorwachstum und -progression spielen.

2 Thrombin-Inhibitoren auf der Basis von N α -Methyl-Arginin

2.1 Ergebnisse

Aus einer Serie von elf Substanzen mit einem P1-R^M und verschiedenen optimierten Sequenzen für das aktive Zentrum und die FRE hatte I-11 (DZPR^M↓TG₅DYEPIPEEAZ_DE, wobei Z=Cyclohexylalanin) den niedrigsten K_i (37 pM) (Steinmetzer *et al.*, 2000). Die C-terminale FRE-Bindesequenz ist von dem *Exosite*-Inhibitor MDL28050 abgeleitet (Krstenansky *et al.*, 1990). Diese Verbindung ist selektiv, da die Serinproteinasen Trypsin, Faktor Xa und Urokinase nicht (K_i > 1 mM) und Plasmin nur schwach (K_i = 0,2 mM) inhibiert werden. I-11 ist in einer gepufferten α -Thrombin-Lösung mindestens 15 Stunden stabil (Steinmetzer *et al.*, 2000). Ähnliche Verbindungen mit R↓P werden unter denselben Bedingungen fast vollständig abgebaut.

Um die strukturellen Gründe für diese stark erhöhte Stabilität zu verstehen, wurde I-11 mit humanem α -Thrombin kokristallisiert und die Kristallstruktur in Raumgruppe C2 bis zu einer Auflösung von 1,8 Å bestimmt. Mit Ausnahme des 149-(oder Autolyse-)loops ist die gesamte Hauptkette von Thrombin durch Elektronendichte definiert und in einer praktisch identischen Konformation wie im Thrombin-Hirulog-1-Komplex (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1991). Für den Inhibitor I-11 ist jedoch nur Elektronendichte für die drei N-terminalen Reste und das C-terminale D10–Z19-Segment sichtbar. Letzteres interagiert mit der FRE in einer sehr ähnlichen

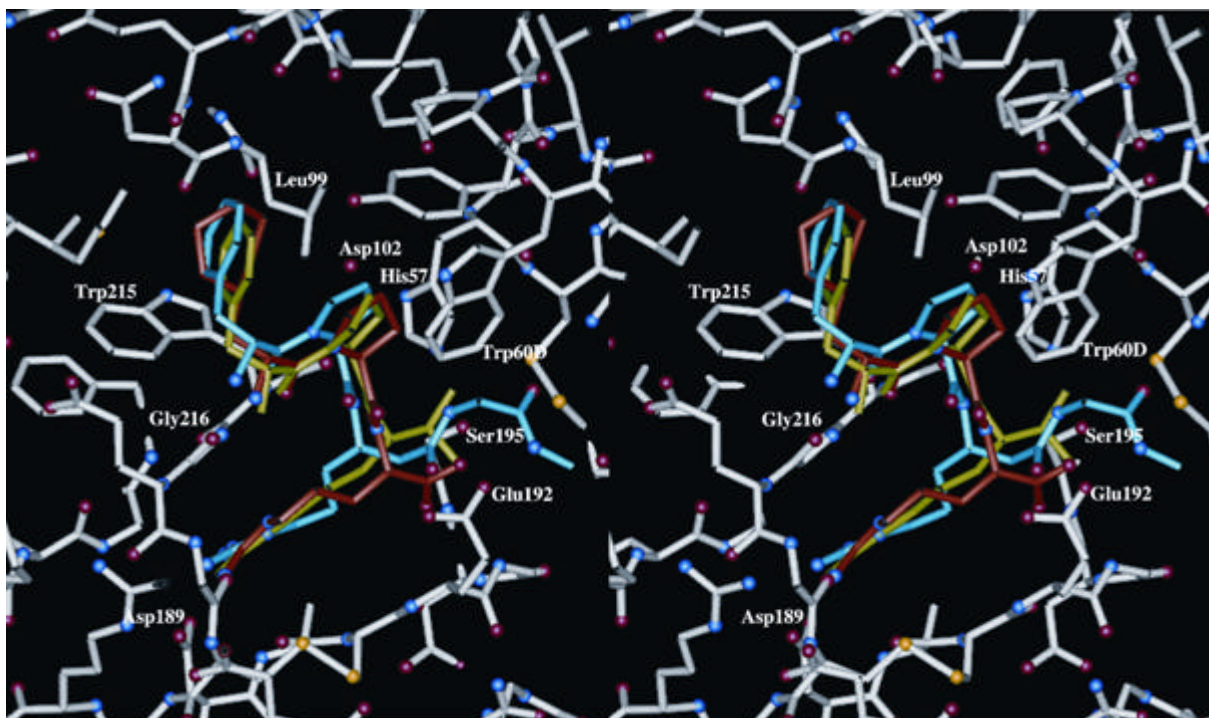


Abbildung 17: Überlagerung der angesprochenen Inhibitoren im aktiven Zentrum von Thrombin. Thrombin: grau; Hirulog-1: blau; PPACK: ocker; I-11: rot; wichtige Thrombin-Reste sind markiert

Weise wie in verwandten Strukturen (Rehse *et al.*, 1995; Qiu *et al.*, 1992). Der Abbruch der Elektronendichte nach R^M kann entweder mit einer hohen Flexibilität im TG₅-Segment oder mit einer Spaltung nach R^M erklärt werden. Die planare Dichte würde dann je nachdem für eine Peptidbindung oder ein C-terminales Carboxylat stehen. Eine Sequenzierung durch Edman-Abbau zeigte jedoch die Existenz eines Peptids mit einem N-terminalen Threonin in einem Verhältnis von ungefähr 1:1 mit dem IVEG-N-Terminus der schweren Kette von Thrombin. Daher spricht alles dafür, daß das Peptid im Kristall nach 14 Tagen zu 100% gespalten war.

Der freie N-Terminus von DZ1 bildet Wasserstoffbrücken mit dem Carbonylsauerstoff von G216 und mehreren Wassermolekülen. Der Cyclohexylring von DZ , ungewöhnlicherweise (vgl. Rehse *et al.*, 1995) in einer Boot-Konformation, ist in die Arylbindestelle (S4) von Thrombin gebunden, der Pyrrolidin-Ring des P2-Prolin in die charakteristische S2-Tasche, ähnlich, aber nicht ganz so tief wie in PPACK-Thrombin (Bode *et al.*, 1989). Das P1-R^M ist jedoch im Gegensatz dazu bedeutend weiter vom aktiven S195 entfernt, so daß seine Seitenkette nicht in der üblichen gestreckten Konformation von Lysin oder Arginin (wie zum Beispiel in PPACK-Thrombin) in die S1-Tasche ragt, sondern geknickt. Das C α -Atom ist im Vergleich zu PPACK um 1,7 Å (Bode *et al.*, 1989), zu Hirulog-3 um 1,4 Å (Qiu *et al.*, 1992), zu BPTI um 1,3 Å (van de Locht *et al.*, 1997) und zum ebenfalls gespaltenen Hirulog-1 um 1,1 Å (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1991) vom aktiven Serin weg verschoben. Die Guanidyl-Stickstoffatome erreichen dennoch beinahe ideale Positionen gegenüber der Carboxylat-Gruppe von D189, mit fast normalen N-O-Abständen von 3,1 bzw. 2,7 Å. Das Wasserstoffatom von N ϵ ist jedoch im Gegensatz zu anderen bekannten Strukturen mit einem P1-Arginin zur Rückseite der S1-Tasche gerichtet, wo es das Wassermolekül 60 in einem Abstand von 2,8 Å bindet. Die R^M-Gruppe liegt in einer von der Carbonylgruppe von

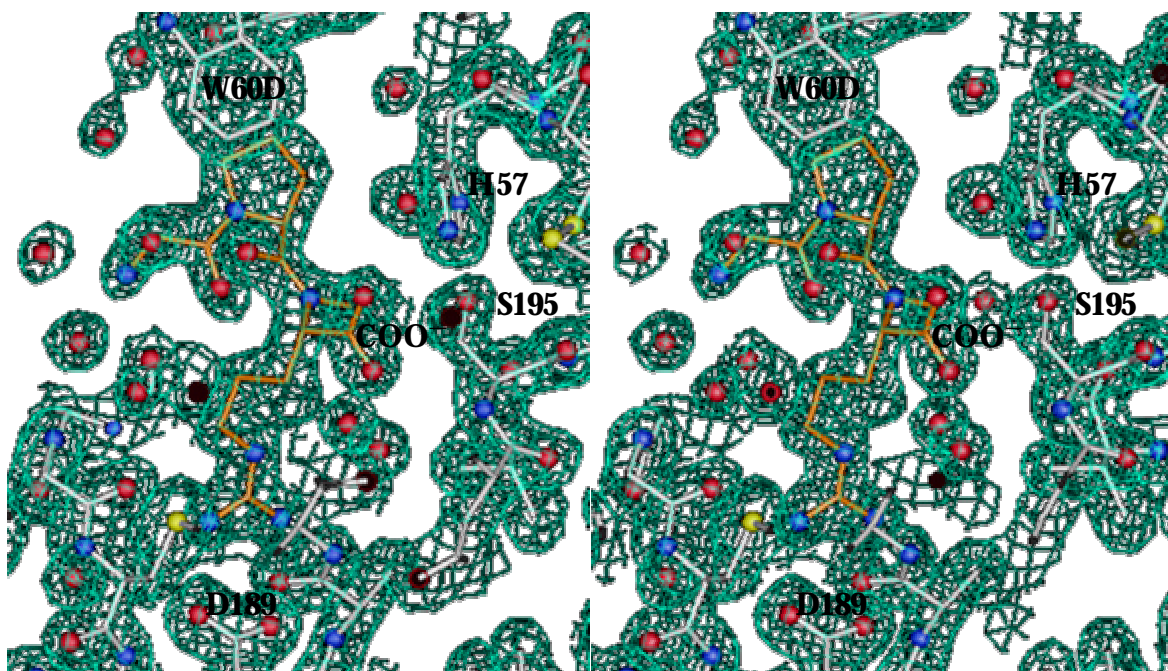


Abbildung 18: Elektronendichte um das aktive Zentrum bei 1,8 Å; I-11: orange; Thrombin: grau

S214 (Abstand 3,0 Å) und dem C β von S195 gebildeten Oberflächen-Delle. Die Seitenkette von S195 ist in gauche(-)-Konformation ($\chi_1 = +80^\circ$), wobei das O γ -Atom in Richtung der C42–C58-Disulfidbrücke gedreht ist. Damit liegt es 3,7 Å von der N-Methylgruppe und 3,5 Å von den beiden R^M-Carboxylatsauerstoffen entfernt. Der Temperaturfaktor (B) des O γ ist signifikant höher als der der anderen Atome von S195 (18 Å² gegenüber 12 Å²), was eine höhere Mobilität in Richtung der zu spaltenden Peptidbindung zumindest andeutet. Das S195-O γ befindet sich in Wasserstoffbrücken mit dem N ϵ_2 von H57 und zwei fest gebundenen Wassermolekülen.

2.2 Diskussion

Es war das Ziel dieser Arbeit, nicht nur Informationen über die Wechselwirkungen innerhalb des I-11–Thrombin-Komplexes zu gewinnen, sondern auch zu zeigen, ob die Methylierung eines basischen P1-Restes generell für den Entwurf stabiler Mimetika von Serinproteinase-Substraten und -Inhibitoren geeignet ist. Die Kristallstruktur zeigt deutlich, daß bei langer Exposition an Thrombin die R^M↓X-Bindung hydrolysiert wird. Dies steht in Widerspruch zu HPLC-Messungen, bei denen nach 15 Stunden noch keine Abbauprodukte sichtbar waren (Steinmetzer *et al.*, 2000). Im nah verwandten Thrombin–Hirulog-1-Komplex mit einer R↓P-Bindung tritt jedoch sogar in Lösung eine vollständige Spaltung auf (Skrzypczak-Jankun *et al.*, 1991). Hirulog-3 mit der β -homo-R↓G-Bindung dagegen ist in Lösung gegen Hydrolyse durch Thrombin stabil, und Elektronendichte existiert für fast die gesamte Kette einschließlich der zu spaltenden Bindung (Qiu *et al.*, 1992). Durch die zusätzliche Methylengruppe von β -homo-Arginin zwischen dem C α und der Carbonylgruppe wird das Peptid „außer Phase“ gebracht, so daß eine Spaltung selbst unter den engen Bindungsverhältnissen im Kristall unmöglich wird. Die vorliegende Struktur erklärt die stark reduzierte Reaktivität der R^M↓X-Bindung. Durch die Bindung des DZPR^{M} -Segments und des C-terminalen Teils an die ungestrichenen Bindestellen bzw. an die FRE wird die R^M↓X-Bindung gleichsam über die S195-Seitenkette gespannt. Darüber hinaus verhindert der Platzbedarf der N α (Me)-Gruppe eine enge Annäherung der zu spaltenden Peptidbindung an das aktive Zentrum und des P1-Stickstoffatoms an die S214-Carbonylgruppe, was für eine effektive Spaltung erforderlich wäre (Coombs *et al.*, 1999). Gleichzeitig drückt die N α (Me)-Gruppe das S195-O γ aus der für die Katalyse produktiven Position. Dies entspricht einer Rotation um χ_1 von etwa -70° (gauche(+)) nach $+80^\circ$ (gauche(-)), einer für die Spaltung ungeeigneten Konformation. Dies wird eher nicht durch die neugebildete Carboxylatgruppe verursacht, da sich das S195-O γ im Falle des ebenfalls gespaltenen Hirulog-1 in der normalen -70° -Konformation befindet (Skrzyp-

czak-Jankun *et al.*, 1991). Im Kristall könnte sich die Seitenkette gelegentlich drehen und sich der zu spaltenden Peptidbindung weit genug nähern, so daß ein nukleophiler Angriff und damit die Spaltung der R^M↓X-Bindung möglich wird. Der erhöhte *B*-Faktor des S195-O $_{\gamma}$ im Vergleich zu den übrigen Atomen dieser Aminosäure spricht für diese Hypothese. In Lösung scheint dieses Ereignis jedoch extrem unwahrscheinlich zu sein, wodurch das Peptid stabil genug für eine praktische Anwendung ist, insbesondere da Peptide im Körper ohnehin relativ kurze Halbwertszeiten im Minutenbereich besitzen. In den Kristallen jedoch ist das Peptid durch die Kristallpackung stärker fixiert, so daß die extrem seltenen Spaltungsereignisse etwas öfter stattfinden könnten.

Durch diese Untersuchungen wurde die molekulare Grundlage für die erhöhte Stabilität bifunktioneller R^M-Inhibitoren aufgeklärt. Die Synthese dieser Peptide ist im Vergleich zu Verbindungen mit Pseudo-Peptidbindungen einfacher, da es sich um kommerziell erhältliche Aminosäuren handelt, die einer normalen Festphasensynthese unterworfen werden können. Zukünftige Modifikationen könnten etwa sterisch anspruchsvollere Alkylgruppen als N $_{\alpha}$ (Me) sein, was wahrscheinlich zu weiter erhöhter Stabilität, wegen des noch größeren Abstands von der idealen Position aber auch zu niedrigerer Affinität führen dürfte.

3 Struktur und biophysikalische Charakterisierung von Staphylocoagulase und Komplexen

3.1 Ergebnisse

Eine Gelfiltration von rekombinanter STC^{1-327} (mSTC) lieferte einen einzelnen Peak bei 38 kD, was darauf schließen läßt, daß das Protein in Lösung als Monomer vorliegt. Die ESI (*electrospray injection*)-Massenspektrometrie zeigte ein Molekulargewicht von 38029 Da für mSTC mit einem Startmethionin, das, wie durch Edman-Abbau bestätigt, nicht prozessiert worden war. Fern-UV-Spektren (Circulardichroismus, CD) zeigen starke Minima der Elliptizität bei 208 und 222 nm, was einen hohen α -Helix-Anteil andeutet. Beim Erhitzen von 10 °C auf 90 °C ergab sich ein Übergang bei etwa 43 °C. Diese Denaturierung war beim Abkühlen nicht reversibel.

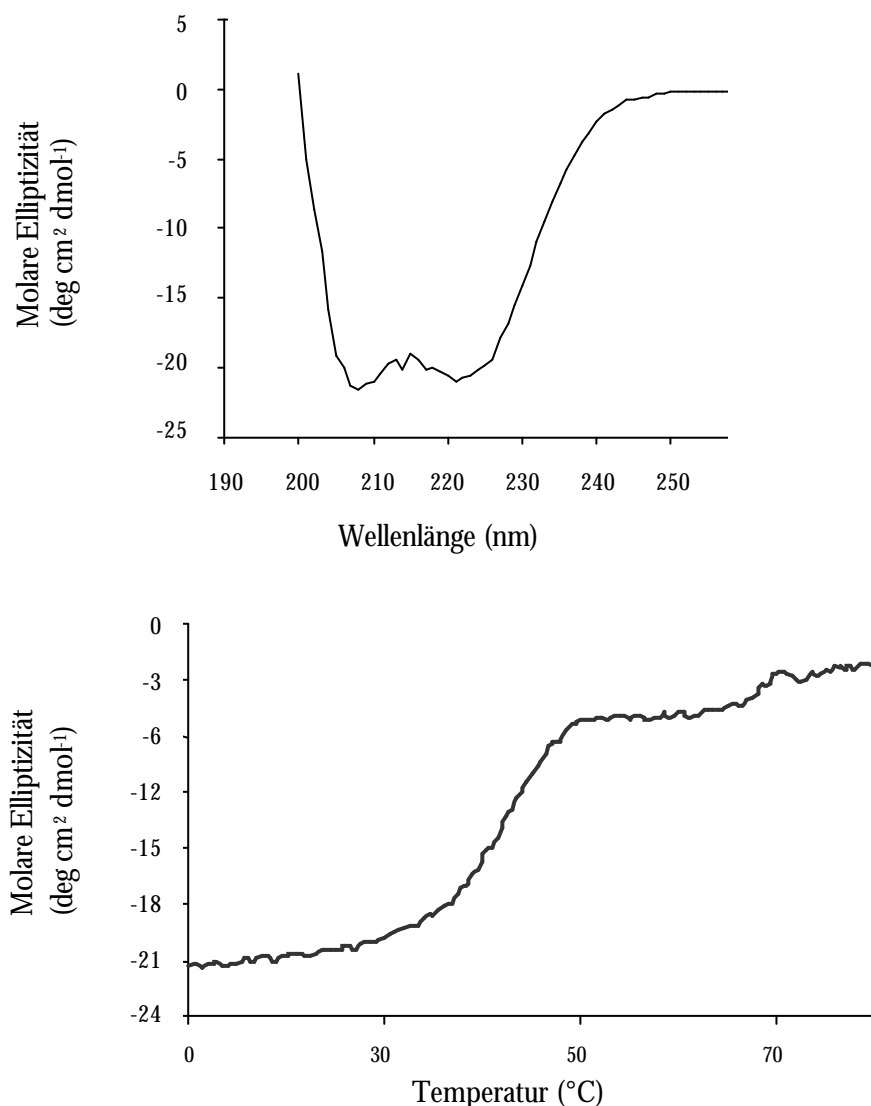


Abbildung 15: Oben: CD-Spektrum bei 20 °C. Unten: Änderung der Elliptizität bei 220 nm beim Erhitzen einer Lösung von mSTC (Heizgeschwindigkeit 10 °C/h)

3.1.1 Wechselwirkung von STC mit (Pro)Thrombin und Fibrinogen

Bandenverschiebungsexperimente auf Nativgelen zeigten keine Wechselwirkung zwischen mSTC allein und Fibrinogen. Daher wurde angenommen, daß die Affinität von monomerer mSTC zu Fgn relativ niedrig ist ($K_D > 1 \mu\text{M}$). Ein ternärer Komplex von mSTC–Thrombin–PPACK mit humanem Fgn konnte jedoch nachgewiesen werden, und zwar mit einer Stöchiometrie von etwa 2 Mol mSTC–Thrombin pro Mol Fgn. Die Bindung wurde durch Deglykosylierung von Fgn nicht geschwächt. Die Fibrinogen-Bindungsaffinität von mSTC und seinem Thrombin-Komplex wurde auch durch *surface plasmon resonance* (SPR)-Experimente am Biacore-2000-Instrument untersucht. Dazu wurde humanes Fgn an einen CM5-Sensorchip gekoppelt. Es ergab sich eine Bindekonstante von $600 \mu\text{M}$ für mSTC allein (nicht gezeigt) und $6 \mu\text{M}$ für den mSTC–Thrombin–PPACK-Komplex.

Nach allen diesen Resultaten besitzen die klonierten STC-Fragmente eine kompakte Struktur und die volle Funktion hinsichtlich Prothrombin-Aktivierung und Fibrinogen-Spaltung.

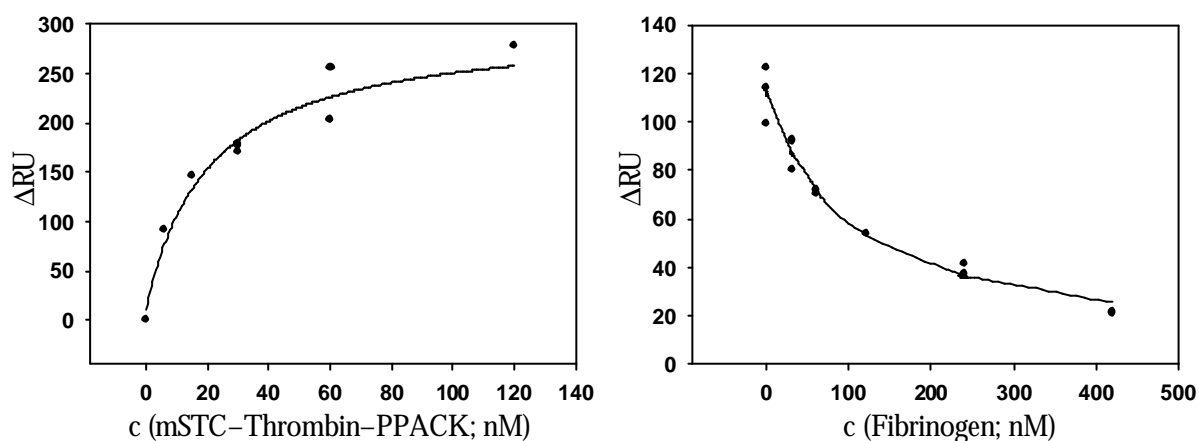


Abbildung 20: Biacore-Ergebnisse. Links: direkte Titration; rechts: indirekte Titration; RU: *resonance units*; c: Konzentration

3.1.2 Struktur von STC–Thrombin

Die Kristallstruktur von an menschliches α -Thrombin gebundener mSTC wurde gelöst, indem die Phaseninformation aus der anomalen Streuung eines kovalent gebundenen Quecksilberatoms am Thrombin-Inhibitor mit derjenigen aus der korrekten Positionierung der Thrombin-Moleküle kombiniert wurde. Die Patterson-Suche mit dem Thrombin-PPACK-Modell (Bode *et al.*, 1989) mit AMORE (Navaza, 2001) lieferte eine richtige Lösung, anhand derer eine Elektronendichtekarte berechnet wurde. Es war deutlich Elektronendichte für den Inhibitor PPACK, der zur Berechnung der Modellphasen nicht herangezogen worden war, und das daran kovalent gebundene Quecksilberatom zu sehen. Die Koordinaten der beiden Hg-Atome in der asymmetrischen Einheit wurden visuell ermittelt und für eine erste Abschätzung der experimentellen Pha-

sen mit CNS (Brunger *et al.*, 1998) verwendet. Die Positionen von Thrombin wurden zur Berechnung einer Maske und eines Translations- und Rotationsoperators herangezogen, anhand derer eine solvensberichtete Mittelung der Elektronendichte durchgeführt wurde. Diese Dichte erlaubte den Einbau einer ersten Helix von mSTC. Diese zusätzliche Modellphaseninformation wurde zu einer Phasenkombination mit den MAD-Phasen verwendet. Erneutes Mitteln und *bulk-solvent*-Korrektur ergaben eine Elektronendichtekarte, die die Fertigstellung des Modells erlaubte.

Das Modell wurde bis zu einem R-Faktor von 20% verfeinert und als Suchmodell für die Lösung des Komplexes von mSTC mit bovinem Thrombin verwendet. Da die Auflösung des humanen Komplexes wesentlich höher war und darüber hinaus nur dieser, nicht aber der bovine Komplex Fgn-Spaltungsaktivität besitzt, wird im folgenden hauptsächlich über ersteren die Rede sein.

Beide Komplexe kristallisierten in Raumgruppe C2 mit einem Dimer in

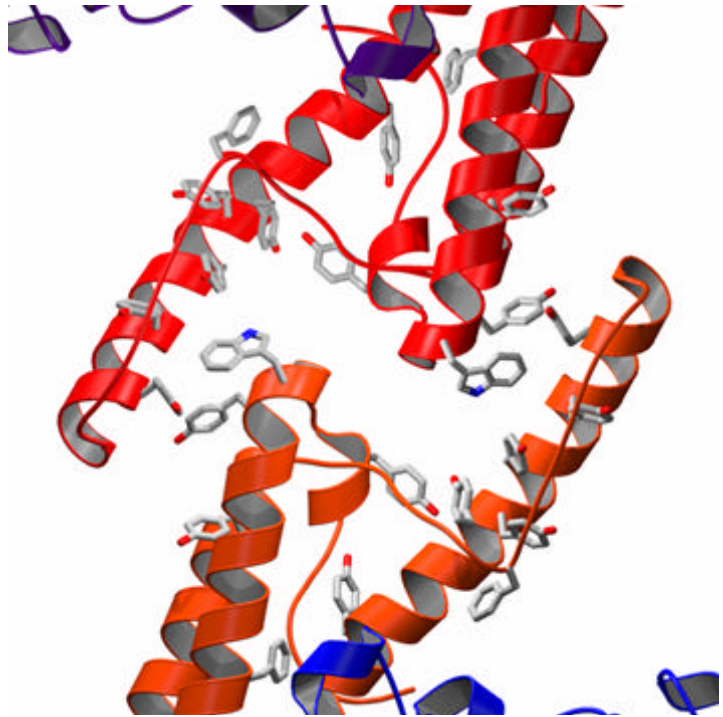


Abbildung 21: Dimerisierungsstelle von STC mit aromatischen Resten; rot/orange: STC, blau/indigo: Thrombin

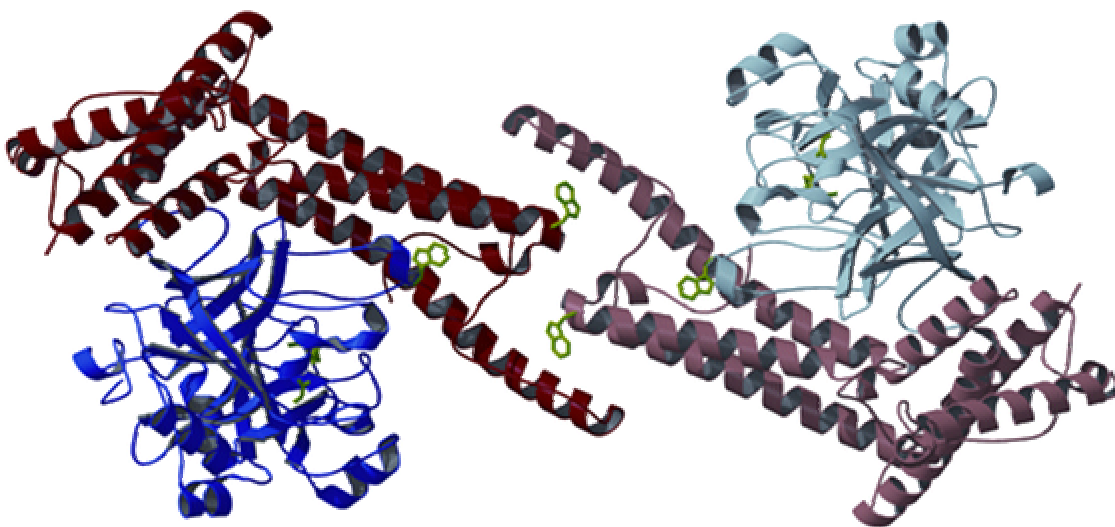


Abbildung 22: Das α -Thrombin—mSTC-Dimer; rot/violett: STC; blau/hellblau: Thrombin; W25 und W148^T sind grün dargestellt

der asymmetrischen Einheit. Diese Dimere werden durch eine lokale zweizählige Achse aufeinander abgebildet. Ein Dimer mißt etwa 150 Å in seiner längsten Ausdehnung, besitzt einen Durchmesser von etwa 65 Å und besteht aus zwei bumerangartigen mSTC-Molekülen, wobei die Thrombin-Moleküle jeweils im Knick sitzen. Die aktiven Zentren der Thrombin-Moleküle sitzen sich in einem S195-Abstand von ca. 73 Å gegenüber. Die Dimere entstehen durch Kontakte zwischen den vorspringenden verlängerten Helices der N-terminalen Domäne von STC. Die Fläche der Schnittstelle beträgt relativ geringe 625 Å². Da diese Helixerweiterung in ähnlichen bakteriellen Domänen nicht vorhanden ist, vermuteten wir, daß diese Kristallkontakte eine physiologisch relevante Anordnung der Monomere repräsentierten. Dafür spricht auch die dimere Symmetrie von Fgn. Analytische Ultrazentrifugation des mSTC–Thrombin–PPACK-Komplexes lieferte ein reales Molekulargewicht von 155±10 kD, was relativ genau einem Dimer entspricht. Da sowohl STC als auch Thrombin in Lösung Monomere sind, nehmen wir an, daß bei der Bildung des Komplexes die Dimerisierungsstelle exponiert wird. Die wesentlich erhöhte Affinität des mSTC–Thrombin-Komplexes für immobilisiertes Fgn im Vergleich zum mSTC-Monomer kann nun durch die Dimerisierung erklärt werden.

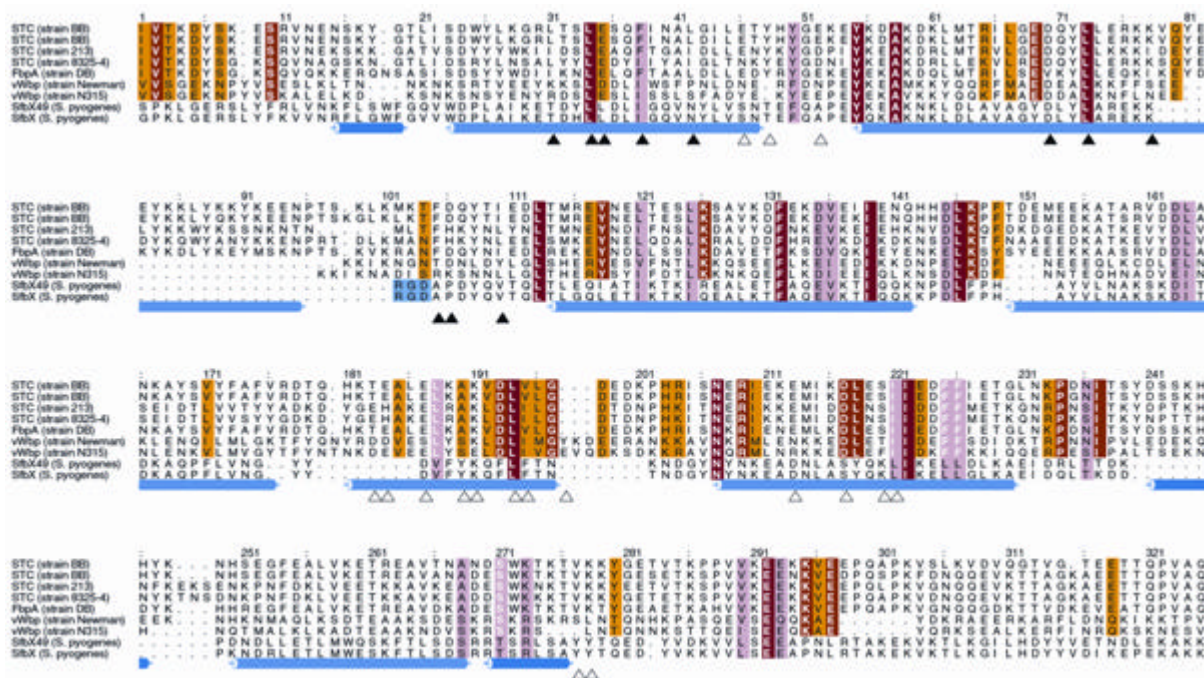


Abbildung 23: Sequenzvergleich von STCs aus verschiedenen Stämmen mit verwandten bakteriellen Proteinen. Rot: strikt konservierte Reste; violett: konservierte Reste; braun: zwischen STC und vWFbp, nicht jedoch SfbX konservierte Reste. Reste in STC, die den Autolyse-loop von Thrombin kontaktieren, sind mit einem weißen Dreieck versehen; Reste, die exosite I kontaktieren, mit einem schwarzen Dreieck. Ein RGD-Motiv in SfbX ist blau markiert.

3.1.3 Struktur von mSTC

mSTC besteht hauptsächlich aus zwei stabartigen α -helikalen Domänen (DI: S7–Q142; DII: T150–G281), die einen Winkel von 110° aufspannen und ist damit strukturell völlig verschieden von SK oder SAK. DI (Reste 1–142) ist ein Bündel aus drei Helices (α_1^I - α_3^I ; I bezeichnet Domäne I) mit Längen zwischen 25 und 41 Aminosäuren, die leicht (α_1^I , α_3^I) bzw. relativ stark gebogen sind (α_2^I). Die C-

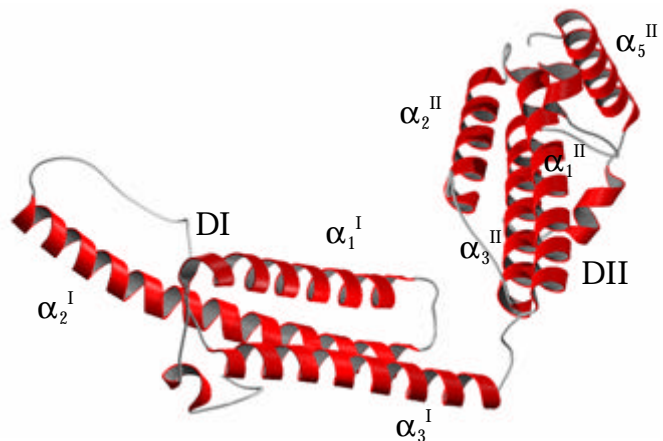


Abbildung 24: Faltung von mSTC; DI: Domäne I; DII: Domäne II

terminale Hälfte der im Vergleich zu allen anderen weitaus längeren Helix steht aus dem Bündel hervor und bildet eine für die Dimerisierung wichtige fingerartige Struktur. DII (Reste 150–281) beginnt mit einem topologisch ähnlichen Drei-Helix-Bündel (T150–G230, α_1^{II} - α_3^{II}) aus 17-27 Resten und ist C-terminal durch drei weitere Helices erweitert. Die längste von ihnen (H250–A268, α_5^{II}) liegt quer zur Bündelachse auf dem Bündel. 85% aller durch Elektronendichte definierten Reste sind in α -helikaler Konformation, wie durch die CD-Ergebnisse schon angedeutet war.

Im Knick zwischen den beiden Domänen befindet sich eine Kontaktfläche von etwa 700 \AA . Die Seitenkette von L146 besetzt die Mitte dieser Schnittstelle und ist umgeben von den Seitenketten konservierter Reste aus dem $\alpha_1^I\alpha_2^I$ -loop und α_3^I auf der DI-Seite und dem $\alpha_2^{II}\alpha_3^{II}$ -loop auf der DII-Seite. Wegen dieser starren und dichtgepackten Schnittstelle könnte diese Domänenanordnung auch bei mSTC alleine in Lösung beibehalten sein.

Die beiden Helix-Bündel lassen sich mit einer *root mean square*-Abweichung von $0,99 \text{ \AA}$ für 63 topologisch äquivalente Reste überlagern. Dies spiegelt sich in der Konservierung von einigen Aminosäuren wieder, v.a. in Helices C/C' mit sechs Resten (R116/209, E120/213, L125/218, S127/220, D131/224 und F132/225). Das Drei-Helix-Bündel-Motiv scheint jedoch eine relativ hohe Sequenz-Variabilität zu erlauben. So sind etwa die Reste 116, 120, 127, 131 und 213 schon innerhalb des verwendeten Stammes stark variiert.

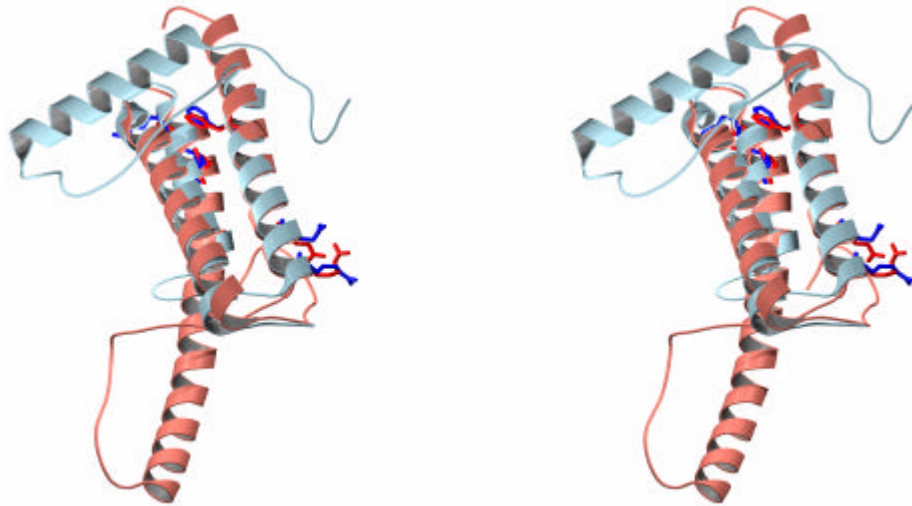


Abbildung 25: Überlagerung der DI- und DII-Domäne von STC; rot: DI, blau: DII; konservierte Reste sind dargestellt

Der Abschnitt E282–Q327 ist in beiden Strukturen nicht durch Elektronendichte definiert, vermutlich wegen seiner besonderen Flexibilität. Sekundärstruktur-Vorhersage-Programme, die die drei Zustände Helix, Faltblatt und ungeordnet berücksichtigen, geben für diese Region praktisch nur solvensexponierte *loops* an, während sie alle größeren α -Helices von mSTC korrekt erkennen. Das Programm VL-XT (<http://www.pondr.com/>) gibt an, daß der größte Teil der C-terminalen Region von mSTC nach Q300 intrinsisch ungeordnet ist. Eine Untersuchung der strukturell zu mSTC homologen Proteine führte zu demselben Ergebnis. In der Kristallpackung ist genügend Platz für die fehlenden 45 Reste. Versuche mit limitierter Proteolyse geben ebenfalls Anlaß zu der Vermutung, daß diese Region auch in Lösung ungeordnet und damit für Proteinase angreifbar ist, obwohl man natürlich nicht ganz ausschließen kann, daß es sich hier um einen sich schnell bewegenden starren Körper mit Sekundärstruktur handelt.

3.1.4 Wechselwirkung zwischen mSTC und Thrombin

Bei der Bildung des Komplexes zwischen mSTC und Thrombin werden etwa 3400 \AA^2 von sonst zugänglicher Oberfläche vom Solvens abgeschirmt. Die STC–Thrombin-Kontakte spielen sich vor allem an zwei Stellen von Thrombin ab: dem Autolyse- oder 148-*loop* am Südrand des aktiven Zentrums und der Fibrinogen-Erkennungsstelle (*Exosite I*) östlich des aktiven Zentrums. Der sehr flexible 148-*loop* paßt sich erheblich an die STC-Oberfläche an und bindet in eine flache hydrophobe Delle zwischen den Helices α_1^I und α_2^I und dem $\alpha_2^I\alpha_3^I$ -*loop* der DI-Domäne mit den Resten I31, L34, F38 und L73, in die ideal die Indolseitenkette von W148^T paßt. Die Positionen der hauptsächlich für die Kontakte verantwortlichen Reste W148^T und V149C^T unterscheiden sich um etwa 10 \AA von den Positionen in PPACK-Thrombin (Bode *et al.*, 1989). K145^T bildet

eine Salzbrücke mit dem Carboxylat von D70, welches darüber hinaus im Wasserstoffbrückenabstand zum Hauptketten-Stickstoff von W148^T liegt. Durch die Komplexbildung wird die interne Salzbrücke E146^T-R221A^T von Thrombin in einer hydrophoben Delle von STC begraben.

Die Bindung an *exosite* I findet über ein Netzwerk polarer Wechselwirkungen von Haupt- und Seitenkettenatomen beider Moleküle des Komplexes statt, unter ihnen mehrere Salzbrücken, und wird durch hydrophobe Kontakte noch verstärkt. Der *70-80-loop* von

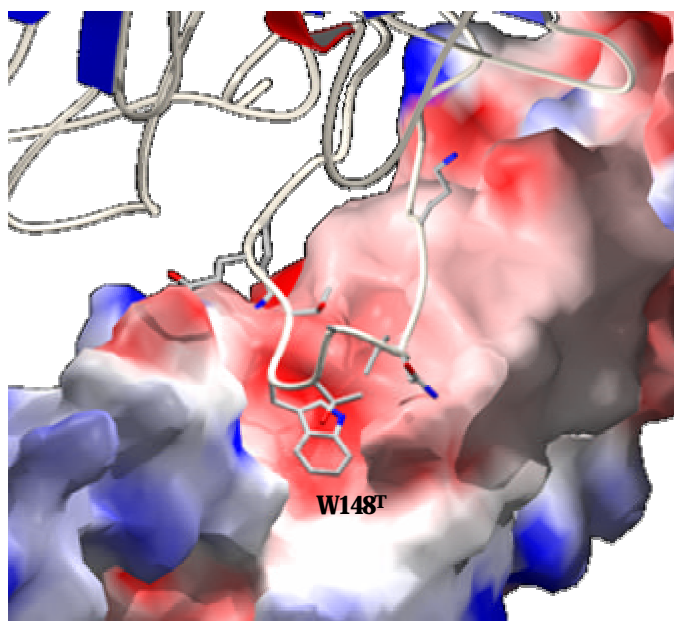


Abbildung 26: Die Indol-Bindetasche von STC für W148^T des Prothrombin-Autolyse-loops; STC in Oberflächendarstellung mit Potentialen

Thrombin liegt in einer Delle aus den Helices α_2^{II} und α_3^{II} von STC, während Helix α_2^{II} an *exosite* I dockt. Hier sind vor allem die beiden thrombinspezifischen Reste Y76^T und R77A^T wichtig. Die R77A^T-Guanidiniumgruppe wird von den Carboxylaten von E213 und D217 umklammert und geht auch noch van-der-Waals-Kontakte mit den Seitenketten von K216 und V227 ein. Der Phenylteil von Y76^T befindet sich in einer hydrophoben Tasche, die von L194, V195 und I221 gebildet wird, und seine Hydroxylgruppe liegt in der polareren Umgebung der Seitenketten von K191, D224 und K278. Insgesamt stehen die fünf Seitenketten R73^T, R75^T, R77A^T, Y76^T und W148^T für ein Fünftel des im Komplex vom Lösungsmittel abgeschirmten Bereichs.

Sieben N-terminale Reste (M0–Y6) sind nicht durch Elektronendichte definiert. Die erste definierte Aminosäure, S7, befindet sich nur etwa 20 Å vom Carboxylat von D194^T entfernt. Dies ließ bereits auf einen Mechanismus unter Beteiligung molekularer Sexualität schließen. Um dies experimentell zu verifizieren, wurde eine mSTC-Variante STC¹⁻³²⁷ ohne das Startmethionin erzeugt und mit der Thrombin-Vorläuferstufe Präthrombin-2 durch *seeding* mit mSTC–Thrombin-Kristallen kristallisiert. Die Gesamtstruktur ist dem mSTC–Thrombin-Komplex sehr ähnlich, mit der Ausnahme, daß das N-terminale Hexapeptid I1–Y6 durch Elektronendichte definiert ist und die Aktivierungstasche von Präthrombin-2 besetzt. I1 bildet eine starke Salzbrücke mit D194^T und eine Wasserstoffbrücke mit der Carbonylgruppe von N143^T. Die Seitenketten der anderen Reste dieses „Aktivierungspeptids“ stehen in weiteren van-der-Waals-Kontakten mit Präthrombin-2. Y6 liegt in einer hydrophoben Tasche zwischen K4, M63, T64, L67 und dem aliphatischen

Teil von K145^T. Dies ist der endgültige Beweis für die Richtigkeit der Molekulare-Sexualität-Hypothese aus dem Jahr 1976 (Bode und Huber, 1976).

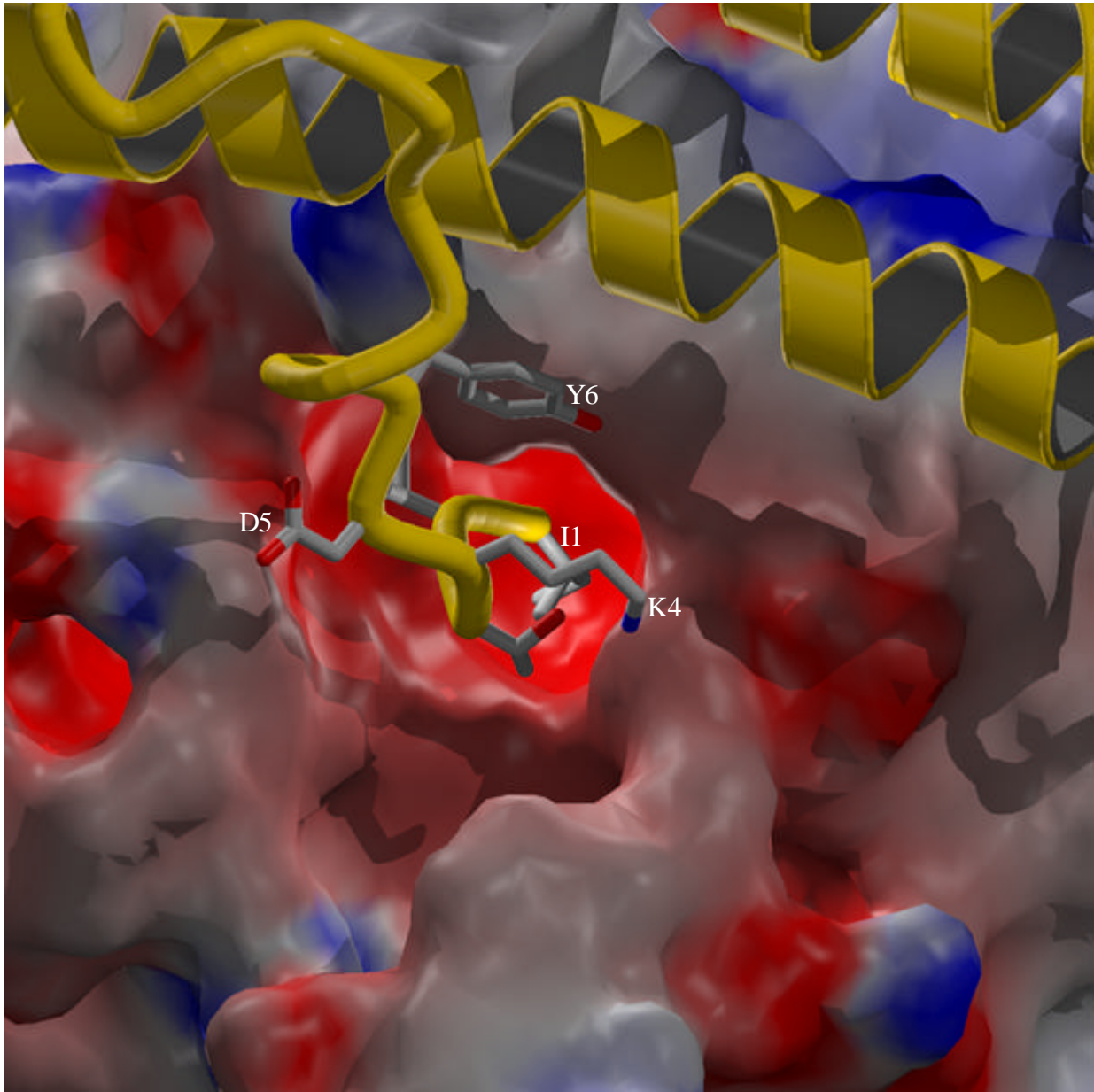


Abbildung 27: Insertion des N-Terminus von STC in die Aktivierungstasche von Präthrombin-2. STC: gelb, Präthrombin-2 in Oberflächendarstellung mit Potentialen

3.2 Diskussion

3.2.1 Struktur von STC

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit die Kristallstrukturen von STC⁰⁻³²⁷ mit Thrombin und STC¹⁻³²⁷ mit Präthrombin-2 gelöst. STC besitzt eine bislang nicht charakterisierte Struktur aus zwei α -helikalen Domänen, die sich wahrscheinlich unabhängig voneinander falten, da entsprechende durch Chymotrypsinolyse erhaltenen Fragmente weiterhin aktiv sind (Kawabata *et al.*, 1986). Die beiden Drei-Helix-Bündel der DI- und DII-Domäne sind strukturell äußerst ähnlich, was sich aber nicht in der Sequenz widerspiegelt. Man kann wohl annehmen, daß die beiden α -Domänen von STC durch Genduplikation entstanden sind. Es wurde gezeigt, daß STC in Lösung ein Monomer ist, bei Bindung an Thrombin jedoch dimerisiert und einen (STC-Prothrombin)₂-Komplex bildet. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch eine Verbiegung der Helix α_2^1 und Stabilisierung einer Ansammlung aromatischer Reste an deren Spitze.

Die meisten früheren Untersuchungen über bakterielle Serinproteinase-Aktivatoren hatten sich auf Streptokinase (Castellino *et al.*, 1976) und Staphylokinase (Collen, 1998) beschränkt. Die Kristallstrukturen von an die katalytische Domäne von Plasmin gebundener SK (Wang *et al.*, 1998) bzw. SAK (Parry *et al.*, 1998) zeigten erstmals, daß SAK und die drei SK-Domänen strukturell homolog sind, was aus der Aminosäuresequenz nicht ersichtlich gewesen war (Parry *et al.*, 2000). Die hier vorgestellte Faltung der α -helikalen Domänen von STC ist mit der α/β -Faltung von SAK und SK nicht verwandt.

3.2.2 Molekulare Sexualität

Wie in den meisten trypsinartigen Serinproteinasen sind die Unterschiede zwischen freiem Thrombin und seinem Vorläufer Präthrombin-2 auf die hauptsächlich ungeordnete „Aktivierungsdomäne“ aus den Abschnitten G142^T–P152^T, P186^T–D194^T, G216^T–G223^T und der Region um die Aktivierungsstelle, E14H^T–E18^T, beschränkt. *Exosite* I scheint ebenfalls teilweise ungeordnet zu sein (Anderson *et al.*, 2000). Der Hauptbeitrag zu den weitreichenden Umordnungen bei der nichtproteolytischen Aktivierung von Prothrombin durch STC scheint durch das streng konservierte N-terminale Hexapeptid I1–Y6 von STC geleistet zu werden. Dieses „Aktivierungspeptid“ bindet natürlich in einer etwas anderen Konformation als der endogene N-Terminus, ersetzt aber die unverzichtbare Salzbrücke mit D194^T. Im Gegensatz zu Streptokinase bindet die STC-Form mit einem Startmethionin jedoch immer noch und aktiviert, aber wesentlich schwächer. Die Bindung von STC an die 37-, 70-80-, 148- und 225-*loops* trägt weiterhin zur Stabilisierung der aktiven Konformation im Zymogen bei, indem diese sonst relativ flexiblen *loops* fixiert

werden. Damit wird die Aktivierungsdomäne geordnet. Dies zeigt sich schon darin, daß Met-mSTC-Prothrombin immer noch chromogene Aktivität besitzt (Paul Bock, persönliche Mitteilung), wobei Prothrombin offenbar in einer aktiven Konformation mit einer vorgeformten, aber leeren Aktivierungstasche vorliegt.

3.2.3 Wechselwirkungen im STC-Prothrombin-Komplex und mit Fibrinogen

Trotz der vielen Kontakte mit STC ist die Struktur von α -Thrombin im Vergleich zu den anderen über 100 deponierten Thrombin-Strukturen praktisch unverändert. Dies ist ein weiteres Beispiel für die These, daß durch die Kofaktor-Bindung die Spezifität des Enzyms vor allem durch die Bereitstellung einer neuen Substrat-Bindestelle, nicht aber durch Änderung der Konformation des aktiven Zentrums verändert wird. Dies trifft bei bakteriellen Kofaktoren nicht nur für STC, sondern auch bei SK und SAK zu, und darüber hinaus bei endogenen Serinproteinase-Kofaktoren wie Thrombomodulin (Fuentes-Prior *et al.*, 2000). Die dimere Struktur von Fgn (Yang *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2000) paßt gut zu der Beobachtung, daß der STC-Thrombin-Komplex als Dimer vorliegt, was die Fgn-Erkennung wesentlich erleichtern dürfte (das einzige weitere Substrat für STC-Prothrombin, Faktor XIII, ist bemerkenswerterweise auch ein intrinsisches Dimer). Die erste Erkennung von Fgn durch den STC-Prothrombin-Komplex muß durch STC erfolgen, da die Fgn-Erkennungsstelle (*exosite* I) von (Pro)Thrombin durch STC völlig bedeckt und damit für die Substratbindung nicht verfügbar ist. Efb/Fib, ein zellwandgebundenes Adhäsins aus Staphylokokken (Palma *et al.*, 1998) konkurriert mit STC um dasselbe Epitop auf Fgn, wahrscheinlich wegen der beiden Proteinen eigenen verwandten Tandem-Wiederholungsregion. Damit besitzt STC mindestens zwei Fgn-Erkennungsstellen, nämlich eine N-terminale, die für die Fgn-Spaltungsaktivität des STC-Prothrombin-Komplexes entscheidend ist, und eine weitere C-terminale innerhalb der Tandem-Wiederholungen.

Die Rolle der Reste jenseits von G281 muß noch weiter untersucht werden. Experimente mit STC-Fragmenten hatten gezeigt, daß die C-terminalen Reste E282–L329 von STC die Ausbildung des aktiven Zentrums von gebundenem Prothrombin begünstigen. Das durch Chymotrypsinolyse entstandene Fragment STC^{131–329} kann, an Präthrombin-1 gebunden, keine Fgn-Spaltungsaktivität entfalten, erzeugt aber partiell eine aktive Konformation im Zymogen, wie durch Titration mit NPGB und Einbau von DFP gezeigt werden konnte (Kawabata *et al.*, 1986). Die amidolytische und die Esterase-Aktivität von STC^{131–329}-Präthrombin-1 sind im Vergleich zu Vollängen-STC um das 640- bzw. 16fache vermindert. STC^{131–280} besitzt dagegen auch keine Fgn-Spaltungsaktivität mehr. Es kann ausgeschlossen werden, daß letzteres Fragment ungefaltet ist, da es weiter an Prothrombin bindet und die Präthrombin-1-Aktivierung durch Vollängen-STC kompetitiv inhibiert. Der Bereich E282–L329 steht jedoch mit unseren Thrombinformen nicht in

Kontakt und ist auch nicht durch Elektronendichte definiert, da vermutlich ungefaltet. Daher muß man annehmen, daß dieser Abschnitt an *kringle 2* von Prothrombin bindet und diese Kontakte zur Stabilisierung des aktiven Zentrums beitragen.

3.2.4 Aktivierungsmechanismus

Anhand der nun zur Verfügung stehenden biochemischen und strukturellen Daten kann folgender Prothrombin-Aktivierungsmechanismus für STC vorgeschlagen werden:

- Die DII-Domäne dockt über elektrostatische Kontakte an Pro-*exosite I* und stabilisiert die aktive Konformation dieser *exosite*. Möglicherweise interagiert der Bereich E282–Q329 mit *kringle 2* von Prothrombin.
- Dadurch gerät die DI-Domäne in die Nähe des Autolyse-*loops* und v.a. von W148^T von Prothrombin. Die Bindung von W148^T in seine Bindetasche stabilisiert die benachbarten aromatischen Reste der Dimerisierungsstelle und induziert eine Verbiegung der Helix α_2^I . Es bildet sich eine Salzbrücke zwischen dem I1 des N-terminalen Peptids und D194^T.
- Dadurch kommt es zur Ordnung der Aktivierungsdomäne (unter Ausbildung der Oxyaniontasche) und zur Bildung des katalytisch aktiven STC–Prothrombin-Dimers. Die C-terminalen Domänen in diesem Komplex sind so angeordnet, daß sie zusammen ein Fgn-Molekül binden können. Die C-terminalen Tandem-Wiederholungen könnten Wechselwirkungen mit der D-Domäne von Fgn aufbauen.
- Als Ergebnis werden die beiden Fibrinopeptid-Spaltstellen $\text{Ac}\alpha\text{-R16}\downarrow\text{G17}$ gleichzeitig den beiden aktiven Zentren präsentiert und gespalten. Dieser Fgn-Mechanismus müßte jedoch noch kristallographisch und / oder mittels Mutageneseanalysen bestätigt werden.

Möglicherweise funktioniert dieser Mechanismus auch umgekehrt, indem durch die Bindung eines Fgn-Moleküls an die DII-Domäne die Dimerisierung ausgelöst wird. An diesen (STC)₂–Fgn-Komplex könnten dann zwei Prothrombin-Moleküle binden.

3.2.5 Perspektiven

Die hier präsentierte Struktur von STC bestätigt die Molekulare-Sexualität-Hypothese. Der bakterielle Kofaktor stabilisiert eine aktive Konformation in Prothrombin durch die Insertion seines N-Terminus in die Aktivierungstasche des Zymogens. STC steht weiterhin für eine Familie von bakteriellen Adhäsionsmolekülen (SfbX) und Aktivatoren von Serinproteinasen (STC, vWbp), wie durch Sequenzvergleiche gezeigt werden konnte. STC, vWbp und SfbX bestehen jeweils aus zwei α -helikalen Domänen und einer C-terminalen intrinsisch ungeordneten Region, die aber trotzdem für die Erkennung von Plasma- oder EZM-Proteinen wie Fgn (STC), Fibro-

nektin (SfbX) oder von-Willebrand-Faktor (vWbp) wichtig sein könnte. Diese Erkenntnisse könnten neue Therapien ermöglichen, die auf der Verhinderung schädlicher, durch bakterielle Kofaktoren induzierter Prozesse basieren.

4 Strukturen der katalytischen Domäne von MT-SP1

4.1 Ergebnisse

4.1.1 Struktur der katalytischen Domäne im Komplex mit Benzamidin

Die katalytische Domäne von MT-SP1 ähnelt einem abgeflachten Ellipsoid mit Durchmessern von 35 und 50 Å. Wie in anderen trypsinartigen Serinproteinasen ist die Kette in zwei benachbarte sechssträngige β -barrels gefaltet, die von drei Transdomänen-Segmenten zusammengehalten werden. Auf der Oberfläche befinden sich eine 3_{10} -Helix (60I-64 in Chymotrypsinogen-numerierung) und zwei α -Helices (164-172 und 235-243). Die katalytische Triade befindet sich an der Schnittstelle der *barrels*, wobei die aktive Spalte dazu senkrecht steht.

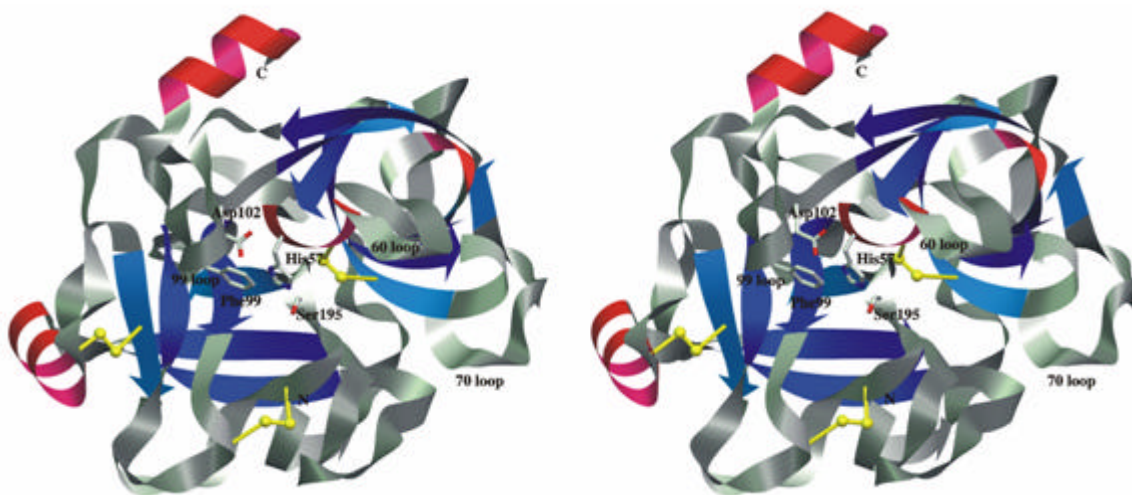


Abbildung 28: Faltung der katalytischen Domäne von MT-SP1; Disulfidbrücken in gelb; wichtige Reste und *loops* sind markiert

Die rekombinante katalytische Domäne beginnt mit V16 (V617 in der durchgehenden Numerierung des Gesamtproteins), entspricht also der B-Kette des aktiven MT-SP1. C122, das in Vollängen-MT-SP1 eine Disulfidbrücke mit C1 der A-Kette bilden würde, ist hier ein ungepaartes Cystein auf der Oberfläche. Die B-Kette enthält drei Disulfidbrücken (C42–C58, C168–C182, C191–C220), die auch in den meisten anderen trypsinartigen Serinproteinasen vorkommen. Die Elektronendichte zeigt jedoch, daß nur etwa die Hälfte der C42–C58-Brücken geschlossen ist. In der anderen Hälfte sind diese Disulfide reduziert, wobei C58 dieselbe Position besetzt wie in der oxidierten Form, das S_{γ} von C42 jedoch in Richtung Molekülinneres gedreht ist und zwischen L33 und dem O_{γ} von Y59 zu liegen kommt. Dadurch wird für die benachbarte Thiolgruppe von C58 Platz geschaffen. Ähnliches wurde kürzlich in einer hochaufgelösten Elektronendichte von rekombinanter menschlicher Urokinase gefunden (Nienaber *et al.*, 2000).

Die α -Ammonium-Gruppe des N-terminalen V16 bildet die hochkonservierte interne Salzbrücke mit dem Seitenketten-Carboxylat von D194 und stabilisiert dadurch die Substratbindestelle und das aktive Zentrum in der katalytisch aktiven Konformation. Die gesamte Kette von V16 bis V244 ist durch Elektrodichte definiert. Nach der C-terminalen α -Helix wendet sich das Rückgrat bei G243 scharf zurück und bildet eine Salzbrücke zwischen dem Carboxylat des C-Terminus und der Guanidyl-Gruppe von R235.

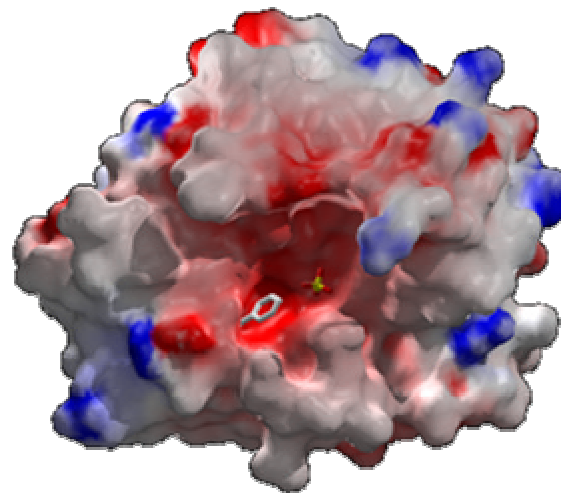


Abbildung 29: Oberfläche der katalytischen Domäne von MT-SP1 mit Oberflächenpotentialen. Benzamidin und ein im „oxyanion hole“ gebundenes SO_4^{2-} -Ion sind dargestellt

Die Überlagerung von mehreren verwandten Serinproteinasen mit MT-SP1 ergibt eine hohe Ähnlichkeit der katalytischen Domäne zu derjenigen von Enteropeptidase (Enterokinase), einer weiteren TTSP (Lu *et al.*, 1999). 222 C_α -Atome topologisch äquivalenter Reste befinden sich innerhalb eines 2-Å-Abstands (*rms*-Abweichung 0,70 Å). Dies trifft für 212 C_α -Atome von bovinem Trypsin zu (*rms*-Abweichung 0,73 Å; Bode und Schwager, 1975). Die nächstbesten Überlagerungen gelingen mit bovinem Chymotrypsin und humanem Thrombin. Ein Sequenzvergleich mit bovinem Chymotrypsin erfordert eine Insertion von neun Resten zwischen I60 und P61, einzelne Insertionen nach G184, E186, A204 und A221 sowie einzelne Deletionen an den

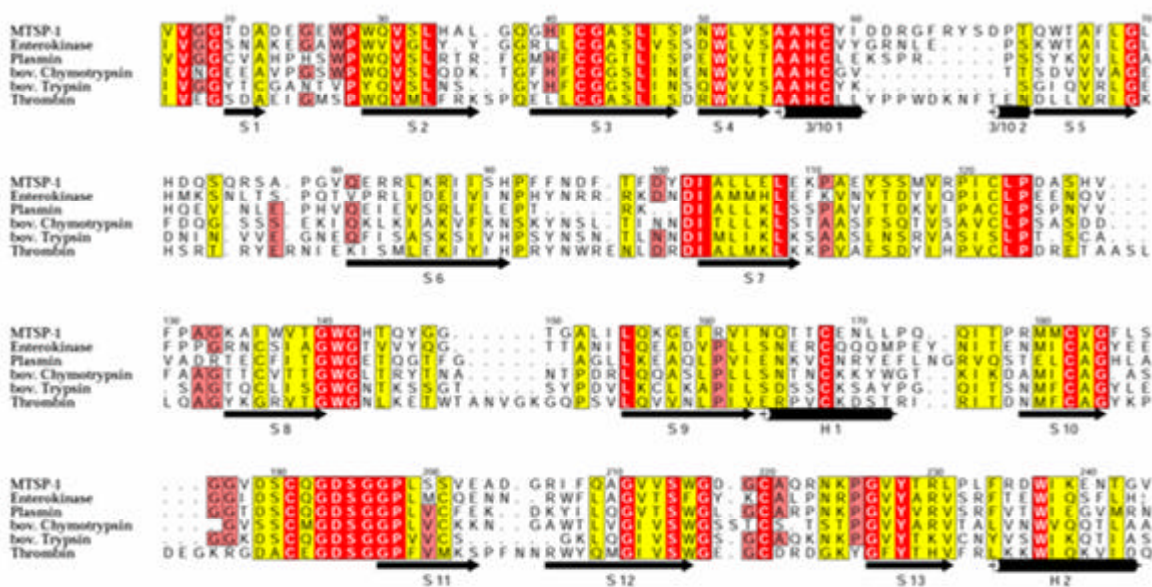


Abbildung 30: Sequenzvergleich der katalytischen Domäne von MT-SP1 mit eng verwandten Serinprotease(domäne)n; rot: konservierte Reste; dunkelrot: meist konservierte Reste; gelb: konservativ ausgetauschte Reste

Positionen 149 und 218. Diese Reste wurden mit auf die Nummer der vorhergehenden Aminosäure folgenden lateinischen Suffixen (A, B, C usw.) bezeichnet.

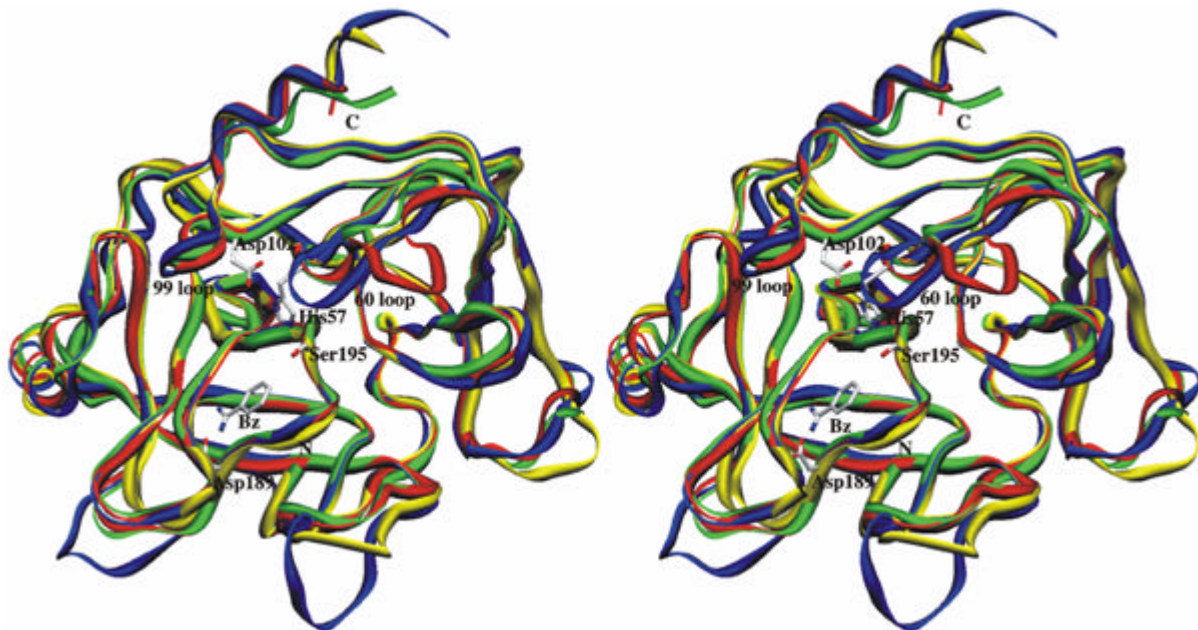


Abbildung 31: rms-Überlagerung der katalytischen Domäne von MT-SP1 (rot) mit eng verwandten Serinproteinasen; blau: Thrombin; gelb: Chymotrypsin; grün: Enterokinase

4.1.1.1 Loops um das aktive Zentrum

Östlich der katalytischen Triade ragt der starre 37-*loop* aus der MT-SP1-Oberfläche hervor. Er enthält zwei Reste der „Zymogen-Triade“ (S32 und H40), die höchstwahrscheinlich zusammen mit D194 die Konformation von pro-MT-SP1 stabilisieren (Bode *et al.*, 1978; Madison *et al.*, 1993). Um Q38 weicht dieser *loop* erheblich vom üblichen Verlauf in anderen Serinproteinasen ab, wobei diese Konformation hauptsächlich durch die Seitenkette von Q38 bestimmt zu sein scheint. Diese wird durch Wasserstoffbrücken seiner Carboxamid-Gruppe mit Y60G und dem π -Elektronensystem von F60E in einer gestreckten Anordnung gehalten.

Der ungewöhnlich große Insertions-*loop* nach I60 hat dieselbe Länge (neun Reste) und eine ähnliche β -Haarnadel-Konformation wie der entsprechende *loop* in Thrombin (Bode *et al.*, 1992), ist aber anders orientiert als in Thrombin. Interne Hauptketten-Seitenketten-Wasserstoffbrücken der Carboxylate von

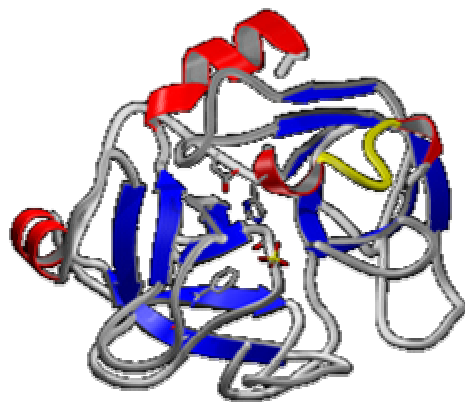


Abbildung 32: Der 60-*loop* von MT-SP1 (gelb)

D60A und D60B stabilisieren die β -Haarnadelschleife. In Thrombin verdeckt der relativ starre 60-*loop* das aktive Zentrum und beeinflusst dadurch die Substratspezifität (Bode *et al.*, 1992), bei MT-SP1 ist er jedoch vom aktiven Zentrum weggedreht und ermöglicht dadurch offeneren Zugang für Substrate oder Inhibitoren.

Nördlich des aktiven Zentrums ragt der 99-*loop* aus der Moleküloberfläche hervor und bildet eine Art Dach über der aktiven Spalte. Er enthält eine bemerkenswerte Anzahl aromatischer Aminosäuren (H91, F93, F94, F97, F99, Y101). Die S2-Tasche wird begrenzt von F99, das die Wasserstoffbrücke zwischen D102 und H57 vom Lösungsmittel abschirmt. Das gut definierte F97 erfüllt eine ähnliche Funktion für die darunterliegenden, ringförmig angeordneten Carbonylgruppen von D96, F97 und T98. Der Autolyse-*loop* von MT-SP1 enthält eine Deletion und ist weniger solvensexponiert als der entsprechende *loop* von Chymotrypsin. Die Seitenkette von H143 liegt in der Mitte des *loops*, der die Südgrenze (oder den „Boden“) der aktiven Spalte bildet. G151 erlaubt größere Seitenketten in der P2'-Position peptidischer Substrate.

In den pankreatischen Serinproteinasen bildet der 70-80-*loop* eine Calcium-Bindestelle, wobei die Carboxylate von E70 und E80 das Calcium-Ion koordinieren. Die Glutamate sind in MT-SP1 durch L70 und V80 ersetzt, wodurch die katalytische Domäne calciumunabhängig wird. Die beiden *loop*-Enden werden aber durch diese hydrophoben Reste und A77A sowie den proximalen Teil von R76 in einer ähnlichen Weise wie in Gegenwart von Ca^{2+} zusammengehalten.

4.1.1.2 Aktives Zentrum und Substratbindetaschen

Die Reste der katalytischen Triade, S195, H57 und D102, sowie weitere katalytische Elemente wie das durch die Rückgrat-Stickstoffe von G193 und S195 erzeugte Oxyanion-Loch sind deckungsgleich zu denen in Trypsin oder Chymotrypsin. Die S1-Tasche westlich von S195 wird von den Segmenten V213–G220, S190–S195, P225–Y228 und der Disulfidbrücke C191–C220 begrenzt. Alle Seitenketten in der Tasche besetzen identische Positionen wie in Trypsin. Dies gilt insbesondere für D189 am Boden der Tasche, das für die Spezifität für basische Reste in P1 verantwortlich zeichnet, und für S190, dessentwegen Lysin in P1 mit ähnlicher Affinität akzeptiert wird wie Arginin, jedoch auch für die Reste der Innenwand (G226, Y228 und V213). Die Phenyl-

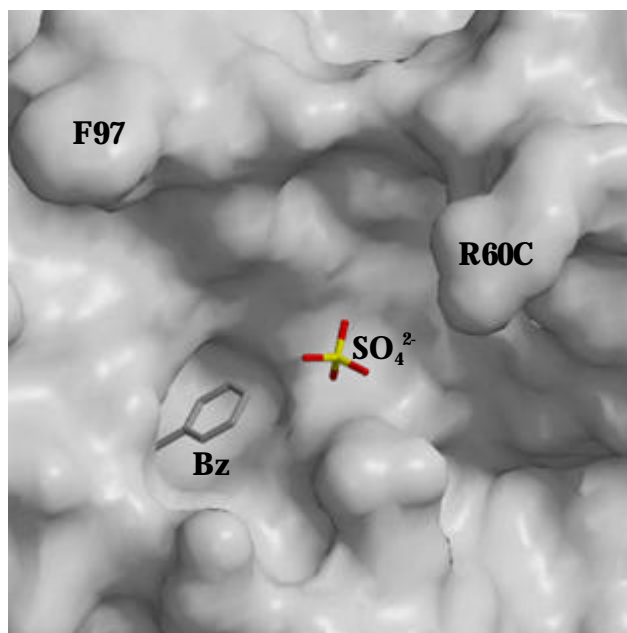


Abbildung 33: Der 99-*loop* und der 60-*loop* ragen aus der Moleküloberfläche hervor

gruppe des Benzamidins liegt eingezwängt zwischen den parallelen Peptidgruppen W215–G216 und C191–Q192, während seine Amidinogruppe dem Carboxylat des D189 am Boden der Tasche gegenübersteht und eine zwei-O/zwei-N-Salzbrücke bildet. Das distale Stickstoffatom befindet sich außerdem in Wasserstoffbrückenabstand zum Carbonylsauerstoff von G219 und zu einem Wassermolekül.

Eine größere S2/S4-Tasche breitet sich oberhalb der S1-Tasche aus, begrenzt durch den Imidazolring von H57 im Osten und den Benzylring von F99 im Norden. Diese Bindestelle kann

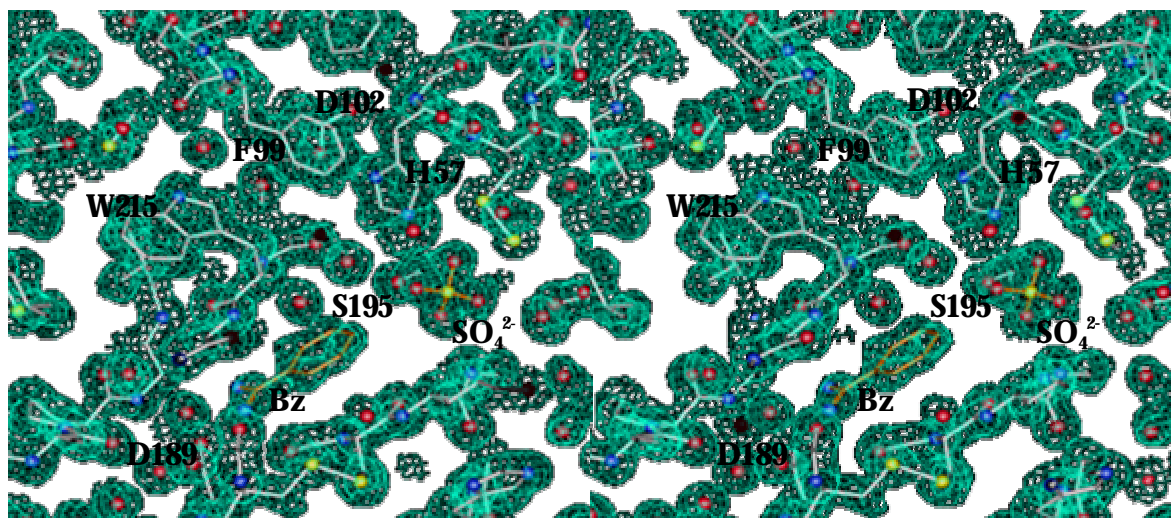


Abbildung 34: Elektronendichte bei 1,3 Å um die Reste des aktiven Zentrums; grau: MT-SP; braun: Benzamidin und Sulfat; wichtige Reste sind beschriftet

kleine hydrophobe P2-Seitenketten aufnehmen. Die benachbarte S4-Tasche wird von den Carbonylgruppen von D96, F97 und T98 umgeben, deren Zugänglichkeit für das Lösungsmittel durch das vorspringende F97 stark eingeschränkt ist. Phenylalanin ist eine sehr seltene Aminosäure in Position 97 chymotrypsinartiger Serinproteinasen; die Seitenkette ist solvensexponiert und doch definiert durch Elektronendichte. Durch das π -Elektronensystem von F99 und das nahe D96 ist die S4-Tasche für die Aufnahme positiv geladener P4-Seitenketten bestens geeignet. Östlich von S195 befindet sich die S1'/S3'-Tasche, die von der C42–C58-Disulfidbrücke, der Isobutyl-Seitenkette von I41 und den Aromaten von Y60G und W64 gebildet wird. Die S1'- und die S3'-Tasche können mit größeren hydrophoben Resten gut gefüllt werden, wie auch die S2'-Bindestelle, die von Q192 und H143 abgegrenzt wird.

4.1.2 Wechselwirkung von MT-SP1 mit Kunitz-Typ-Inhibitoren

Da der natürliche MT-SP1-Inhibitor HAI-1 nicht zur Verfügung stand, wurde zur Untersuchung der Interaktionen mit Inhibitoren vom Kunitz-Typ Aprotinin / BPTI (basischer pankreatischer Trypsininhibitor) verwendet. BPTI ist zu 36% identisch mit der ersten Kunitz-

Domäne von HAI-1 und somit gut geeignet, letztere in einem Komplex zu substituieren. Die Kristallstruktur des Komplexes aus der katalytischen Domäne von MT-SP1 und BPTI wurde bis zu einer Auflösung von 2,9 Å gelöst. BPTI dockt in die konkave Substratbindungs-Oberfläche von MT-SP1 über seinen *reactive site loop* (T11₁–I18₁), der die zu spaltende Bindung enthält (K15₁–A16₁), und das sekundäre Bindeselement G36₁–R39₁. Diese Bindungsart entspricht dem prototypischen Trypsin–BPTI-Komplex (Huber *et al.*, 1974). Der *reactive site loop* läuft antiparallel zu den MT-SP1-Segmenten S214–D217 und H40–I41, wobei sich die Seitenkette von K15₁ in die S1-

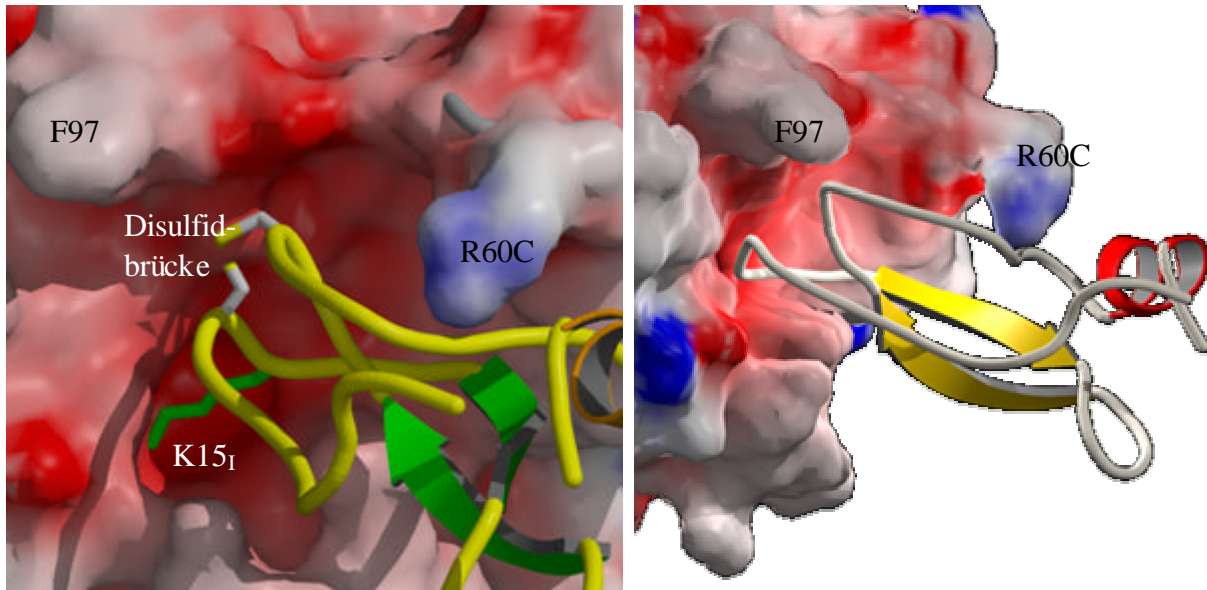


Abbildung 35: Bindungsweise von BPTI an die katalytische Domäne von MT-SP1; links: in Standardorientierung, rechts: 90° um die y-Achse gedreht; MT-SP1 in Oberflächendarstellung mit Potentialen

Tasche erstreckt und eine Salzbrücke mit D189 bildet. Wegen des für Kunitz-Domänen typischen Hauptketten-Knicks bei P3 liegt der Pyrrolidin-Ring von P13₁ in der S4-Höhlung.

Wäre der Benzylring von F99 in derselben Position wie in der Benzamidin-Struktur, so

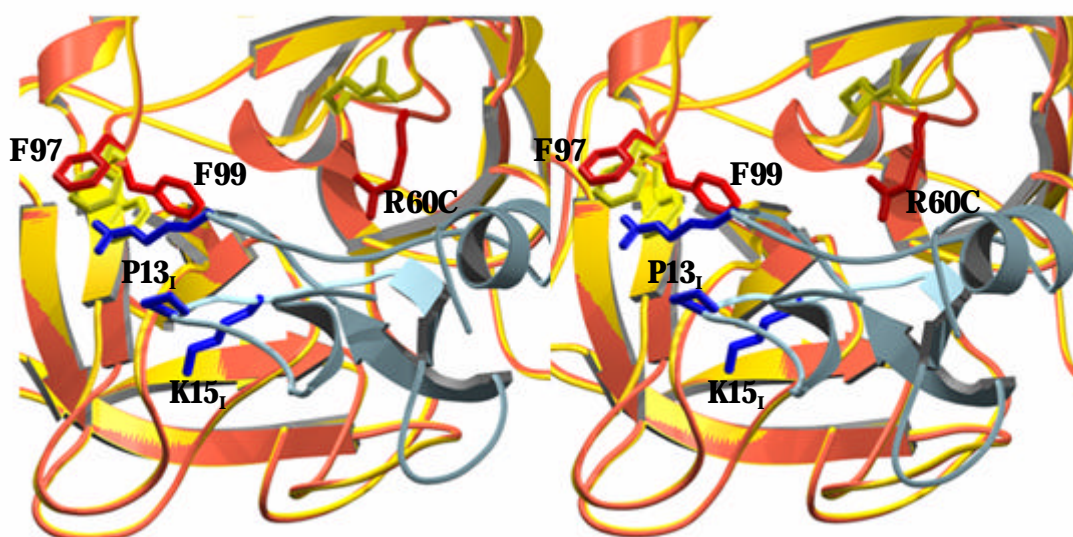


Abbildung 36: Die Seitenkette von F99 schwingt bei BPTI-Bindung aus der S2-Tasche; rot: MT-SP1—Bz-Konformation; gelb: MT-SP1—BPTI-Konformation; blau: BPTI

käme es bei der Bindung von BPTI zu einem Zusammenstoß mit der C14_I-C38_I-Disulfidbrücke. Dies wird jedoch durch eine einfache Rotation der F99-Seitenkette vermieden, wodurch die S2-Tasche vergrößert und für die o.g. Disulfidbrücke zugänglich wird. Die Seitenkette von R39_I erstreckt sich in Richtung des 99-*loops*, wobei die Guanidylgruppe zwischen den Benzylringen von F97 und F99 zu liegen kommt und eine Wasserstoffbrücke mit dem Rückgrat-Carbonylsauerstoff bildet, die durch den Abschirmeffekt von F97 wesentlich stärker sein sollte als etwa im Trypsin-BPTI-Komplex. Die Seitenketten von A16_I und I18_I fügen sich gut in die hydrophobe S1'/S3'-Tasche ein.

Der charakteristisch vorspringende 60-*loop* von MT-SP1 bietet im Vergleich zu etwa Trypsin eine große zusätzliche Oberfläche für neue Kontakte mit BPTI oder anderen Kunitz-Domänen an. Im Vergleich zur Benzamidin-Struktur nimmt der 60-*loop* eine etwas andere Konformation ein, um etwa die Bildung einer Salzbrücke zwischen D60B und R20_I und geladene Wasserstoffbrücken zwischen R60C und den Carbonylen von K41_I und N44_I zu ermöglichen. Der gut definierte 60-*loop* scheint also eine limitierte Möglichkeit zu Adaptation an den starren Kunitz-Inhibitor zu besitzen. Darin unterscheidet er sich stark von dem ebenso exponierten, aber viel rigideren 60-*loop* von Thrombin, der die S2-Tasche und den Zugang für größere Substrate oder Proteininhibitoren begrenzt. Der 60-*loop* von MT-SP1 jedoch behindert die BPTI-Bindung nicht, sondern verstärkt sie sogar noch durch die Ausbildung zahlreicher günstiger Kontakte.

4.2 Diskussion

Die katalytische Domäne des menschlichen MT-SP1 besitzt die Faltung einer chymotrypsinartigen Serinproteinase, aber darüber hinaus einige charakteristische Eigenschaften wie die hydrophoben/sauren S2/S4-Bindetaschen und einen exponierten 60-*loop*, die die Substraterkennungs- und -bindungseigenschaften stark beeinflussen. MT-SP1 spaltet ausgewählte Substrate so effektiv wie Trypsin, zeigt aber eine wesentlich höhere Substratspezifität als letzteres (Takeuchi *et al.*, 2000). Dies erklärt sich einerseits aus der praktischen Identität der S1-Tasche in den beiden Enzymen, was eine starke Bindung von Substraten und eine optimale Präsentation ihrer zu spaltenden Peptidbindung ermöglicht, jedoch auch aus klaren strukturellen Unterschieden in den weiteren Bindestellen. In ihrer Gestalt und chemischen Zusammensetzung ist die S1-Tasche von MT-SP1 und Trypsin sowohl für Lysin- als auch Argininreste in P1 sehr geeignet, wie auch experimentell gezeigt (Takeuchi *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1999b). S190 trägt zu einer verbesserten Lysin-Bindung bei, da seine Seitenkette einen zusätzlichen Wasserstoffbrückenakzeptor für die Stabilisierung der α -Ammoniumgruppe darstellt. Arginin in P1 wird wegen der besseren Raumauffüllung durch die Guanidiniumgruppe genauso gerne akzeptiert.

Die hydrophobe S2-Tasche von MT-SP1 eignet sich für die Bindung von kleinen bis mittleren hydrophoben Seitenketten. Die Rotation der F99-Seitenkette in der BPTI-Struktur zeigt, daß die S2-Stelle nicht völlig starr ist, wie durch *positional scanning*-Ergebnisse vorhergesagt (Takeuchi *et al.*, 2000), die gezeigt hatten, daß MT-SP1 eine Anzahl von Aminosäuren in P2 zuläßt.

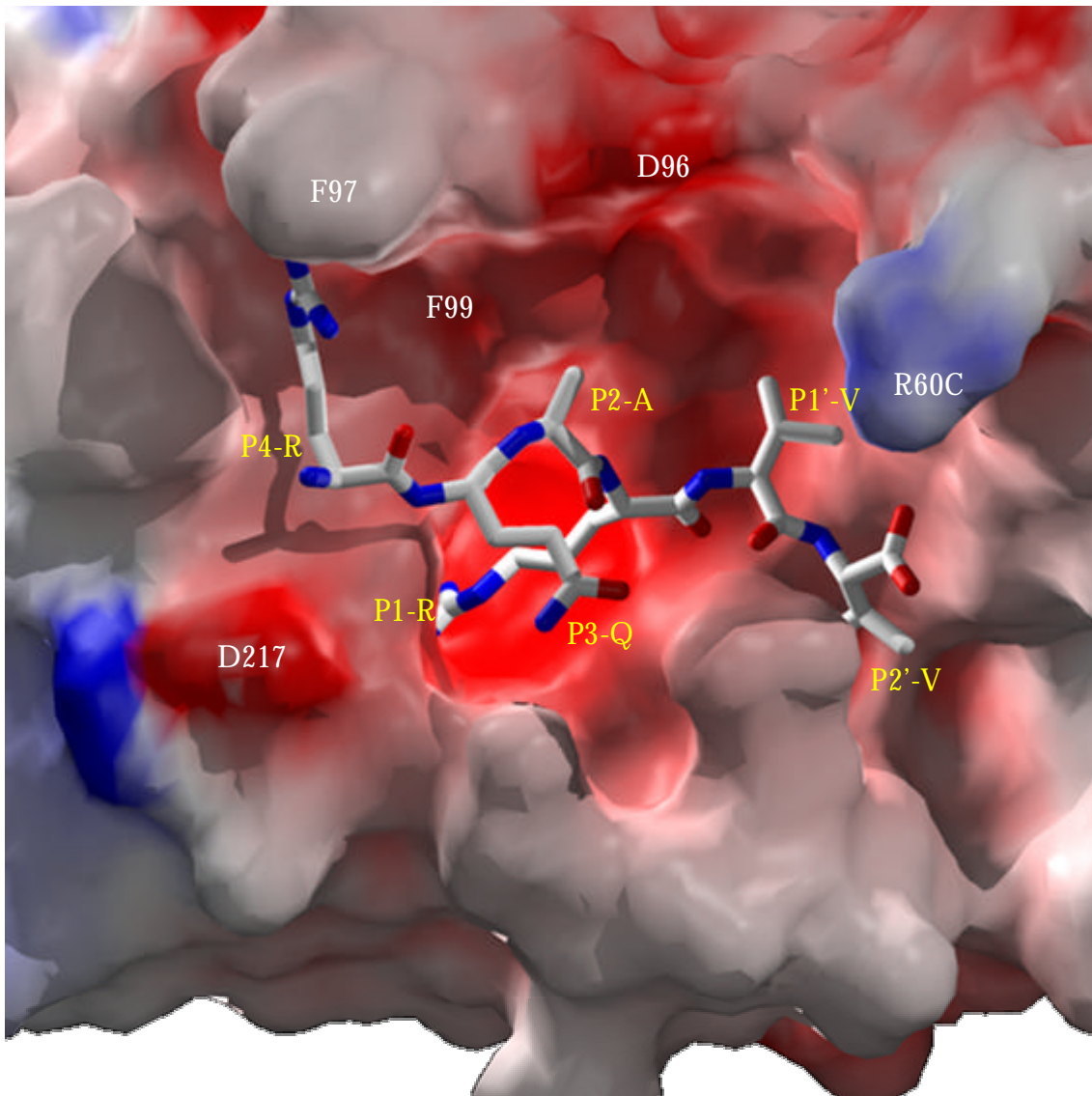


Abbildung 37: Umgebung des aktiven Zentrums mit Oberflächenpotentialen und dem Modell eines Hexapeptids mit einer optimalen Spaltsequenz (P4-RQAR↓VV-P2')

Bei diesen Experimenten hatte sich auch eine Präferenz für basische Reste in P4 oder P3 ergeben, nicht jedoch in P4 und P3 zugleich. Diese interessante Spezifität könnte auf elektrostatischen Wechselwirkungen mit den sauren Seitenketten von D217 oder D96 beruhen, die bestimmte Peptidsubstrate während deren Annäherung an das Enzym günstig vororientieren könnten. In der kanonischen Bindungsweise, bei der Peptidsubstrate sich gestreckt antiparallel an das Segment S214–D217 anlagern würden, würde eine P4-Lysin- oder -Arginin-Seitenkette sich

nordwärts in Richtung des 99-*loops* erstrecken und dabei das D96-Carboxylat zwar nicht direkt erreichen, aber mit dem Rückgrat-Carbonyl von F97 eine geladene Wasserstoffbrücke bilden. Darüber hinaus wäre auch eine Wechselwirkung mit dem von den Rückgrat-Carbonylen von D96, F97 und T98 erzeugten negativen Oberflächenpotential der S4-Stelle denkbar. Die S4-Tasche erinnert etwas an die entsprechende Stelle in Gerinnungsfaktor Xa, die dort auch als Kationen-Bindestelle fungiert (Stubbs *et al.*, 1995). Im BPTI-Komplex ist die Bindung von basischen Seitenketten in die S4-Tasche exemplifiziert, wo R39₁ zwar aus dem sekundären Bindesegment stammt, aber seine Guanidylgruppe genau in die von F97 geschützte Bindestelle einfügt.

Die Seitenkette von P3-Resten zeigt in kanonisch gebundenen Substraten von der Enzymoberfläche weg und bildet eine Wasserstoffbrücke mit dem Carboxamid von Q192. Eine geknickte Konformation wie etwa in Kunitz-Inhibitoren ist unwahrscheinlich, aber zumindest denkbar: dann würde die P3-Seitenkette sich in die S4-Tasche und damit Richtung 99-*loop* erstrecken. Dafür wäre aber eine Drehung des Substratrückgrats erforderlich, was die Inter-Hauptketten-Wasserstoffbrücken mit G216 erheblich schwächen würde. In beiden Konformationen kann ein basischer P3-Rest jedoch mit dem negativen Potential der S4-Tasche wechselwirken. Solche elektrostatischen Ferninteraktionen zwischen Seitenkettenladungen und komplementären Oberflächenpotentialen gibt es oft in Protein-Protein-Komplexen. So beeinflusst im Thrombin-Hirudin-Komplex die Entfernung von nicht an direkten Salzbrücken beteiligten negativen Ladungen die elektrostatischen Wechselwirkungen stark. Das relativ unwahrscheinliche gleichzeitige Vorkommen von basischen Seitenketten in P3 und P4 (Takeuchi *et al.*, 2000) erklärt sich somit durch wechselseitige Ladungskompensation und Ausschluß von derselben S4-Bindetasche.

HAI-1 scheint der physiologische Inhibitor von MT-SP1 zu sein (Lin *et al.*, 1999a). Auf der BPTI-Struktur basierend erstand ein Modell des Komplexes aus der katalytischen Domäne von MT-SP1 und der ersten Kunitz-Domäne von HAI-1, die zu 36% identisch ist mit BPTI und aufgrund ihrer Sequenz höchstwahrscheinlich die Domäne ist, die ins aktive Zentrum bindet. Das Modell zeigt eine Reihe von günstigen Kontakten zwischen der ersten Kunitz-Domäne und MT-SP1, und zwar sowohl zwischen dem *reactive site loop* (G12₁-F18₁) und der aktiven Spalte als auch an weiteren Kontaktoberflächen wie dem 60-*loop*. Ein relativ seltenes P3'-F18₁ paßt sehr gut in die S1'/S3'-Tasche von MT-SP1. Die Seitenkette von R13₁ sollte wohl in die S4-Tasche reichen, wo die Guanidylgruppe in ähnlicher Weise wie R39₁ im BPTI-Komplex mit den 99-*loop*-Carbonylen interagieren würde.

Die Sequenz der zweiten Kunitz-Domäne von HAI-1 (GLCK↓ESI) entspricht nicht der Substratspezifität von MT-SP1, enthält jedoch eine Anzahl von negativ geladenen Resten in seiner C-terminalen Helix, die elektrostatische Kontakte mit basischen Oberflächenresten von MT-

SP1 bilden könnten. Diese basischen Reste (R75, R83, R85, K110) könnten eine *exosite* wie in Thrombin darstellen, deren Erkennung die Affinität und Spezifität der Bindung von HAI-1 an MT-SP1 erheblich erhöhen könnte. Ein ähnlicher Fall liegt im Thrombin-Komplex mit Ornithodorin vor, einem Zwei-Kunitz-Domänen-Inhibitor aus der Zecke *Ornithodoros moubata* (van de Locht *et al.*, 1996). Dort bindet nur die erste Domäne an das aktive Zentrum, die zweite jedoch an die anionenbindende *exosite* I von Thrombin.

Die Kristallstrukturen von MT-SP1 in Komplex mit den Inhibitoren Benzamidin und BPTI stellen einen ersten Schritt in die Richtung des Designs spezifischer Inhibitoren gegen dieses höchstwahrscheinlich an Tumorprozessen beteiligten Enzyms dar. *Sunflower*-Trypsin-Inhibitor 1 (SFTI-1) ist ein subnanomolarer Inhibitor von MT-SP1 (0,92 nM; Long *et al.*, 2001). Dies ist nicht überraschend, da die P4–P2'-Sequenz RCTK↓SI fast ideal der Substratspezifität von MT-SP1 entspricht. In Versuchen, mittels Homologie-Modellierung mit Thrombin erste Inhibitoren zu finden, wurden ausgehend von Hexamidin Bis-Benzamidine mit einem K_i bis zu 208 nM und einer 13fachen Spezifität gegenüber Thrombin identifiziert (Enyedy *et al.*, 2001).

In den verwendeten Benzamidin-Kristallen ist das aktive Zentrum für kleine Moleküle gut zugänglich, was die strukturbasierte Entwicklung von spezifischen Inhibitoren enorm erleichtern sollte. Anhand dieser ersten Struktur kann auch die Struktur anderer TTSPs modelliert werden. Kleinmolekülinhibitoren könnten helfen, die biologische und pathologische Rolle von einzelnen TTSPs aufzuklären und nebenbei erste *lead*-Substanzen zukünftiger Krebsmedikamente sein.

5 Materialien und Methoden

5.1 Chemikalien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Aldrich, Biomol, Difco, Fluka, Merck, Roth, Serva und Sigma bezogen und waren mindestens vom Reinheitsgrad „zur Analyse“ (*p.a.*). Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Amicon, Eppendorf, Millipore, Qiagen, Stratagene und BioRad bezogen.

Benutzte Geräte und Materialien: FPLC LCC-500 (Pharmacia), Kolbenhubpipetten (Eppendorf), UV-VIS-Spektrophotometer Lambda 17 (Perkin Elmer), Ultrazentrifuge L7-55 mit Rotor Ti-45 (Beckman), Tischzentrifugen, Zentrifuge Avanti mit Rotor JA20 (Beckman), Zentrifugen J2-21 und J2-21M mit Rotoren JA10 und JA20 sowie J-6M/E mit Rotor JS4.2 (Beckman), Amicon-Rührzelleneinheit (Amicon), Ultrafiltrationsmembranen YM30 (Amicon), Centriprep 30 Mikrokonzentratoren (Amicon), Centricon 30 Mikrokonzentratoren (Amicon), Ultrafree 30 Mikrokonzentratoren (Millipore), Partikelfilter Millex HA 22 μm (Millipore), Biacore-X (Biacore), Ultrazentrifuge Beckman-XL-I (Beckman), Image Plate-System (MarResearch), CCD-System (MarResearch), Röntgengenerator RTP300 (Rigaku).

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Herstellung elektrokompetenter Zellen

Steriles LB-Medium (*Luria-Bertani*-Medium) wurde mit 2% einer LB- \dot{u} .N.-Kultur von *E. coli* BL21(DE3) angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,5 inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und das Pellet in eisgekühltem ddH_2O resuspendiert. Zentrifugieren und Resuspendieren wurden wiederholt. Das Pellet wurde mit eisgekühltem 15% Glycerin gewaschen, erneut zentrifugiert, der Überstand quantitativ entfernt und das Pellet im 1,5fachen des Pelletvolumens eisgekühlten 15% Glycerins resuspendiert. Diese Zellen können bei -80°C gelagert werden.

5.2.2 Transformation

Das Plasmid pET-3C-STC¹⁻³²⁷ wurde von S. Kawabata, Kyushu-Universität, Japan zur Verfügung gestellt. Kompetente Zellen vom Typ *E. coli* BL21(DE3) wurden mit obigem Plasmid transformiert. Dazu wurden elektrokompetente Zellen zusammen mit dem Plasmid in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben und diese in einen Elektroporator 1000 (Stratagene) gestellt. Die Elektroporation wurde nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Sofort an-

schließlich wurde die Bakteriensuspension mit 1 ml LB-Medium versetzt, vorsichtig gemischt, 30 min bei 37 °C inkubiert, auf LB-Agar mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und ü.N. bei 37 °C inkubiert.

5.2.3 Glyzerinkulturen

Einzelkolonien der Transformation wurden mit sterilen Zahnstochern aufgenommen und in 50 ml LB-Medium überführt. Die Zellen wuchsen 6-18 h bei 37 °C bis zu einer OD_{600} von etwa 0,8. Die Kultur wurde bei 5000 g und 4 °C 15 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 0,5 ml LB-Medium resuspendiert. Dann wurde 15% Glyzerin zugegeben und schnell gemischt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Die Entnahme erfolgte mit einer Impföse, so daß kein Auftauen der Kultur nötig war.

5.3 Arbeiten mit Proteinen

5.3.1 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteine wurden vor der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Trichloressigsäure (TCA) gefällt, um eine höhere Konzentration zu erreichen oder um Kalium-Ionen zu entfernen, da diese mit Dodecylsulfat einen Niederschlag bilden, der die Gelelektrophorese stört. Eine Probe der Proteinlösung wurde mit 12 % (w/v) TCA versetzt, die Proteine 10 min bei 4 °C gefällt und anschließend sedimentiert (17000 g, RT, 5 min). Das Sediment wurde danach in 10-15 µl Proteinprobenpuffer (siehe PAGE) resuspendiert. Wenn die Farbe des Bromphenolblau von blau nach gelb umschlug, wurde die Lösung mit 2 M Tris-HCl pH 8,8 in 1-µl-Schritten neutralisiert. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die Probe 5 min bei 95 °C inkubiert.

5.3.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In dieser Arbeit wurde die Variante nach Laemmli (Laemmli, 1970) verwendet. Je 10 ml Gellösung werden kurz vor dem Gießen der Gele 20 µl TEMED und 10 µl einer Ammoniumperoxidisulfatlösung (10 % (w/v) APS in H₂O) zugegeben.

Die Proteinproben wurden 1:1 mit Proteinprobenpuffer gemischt, 5 min bei 95 °C inkubiert, um alle Proteine restlos zu denaturieren, und danach auf das Gel aufgetragen. Der Gel-Lauf wurde bei einer konstanten Stromstärke von 40 mA und max. 250 V durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese (wenn die Bande des Farbstoffes das Gel gerade verläßt) wurden die Gele mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

5.3.3 Färben von Proteingelen

Zum Anfärben der Proteingele wurde die gegenüber einer Silberfärbung deutlich schnellere und einfachere Färbung mit *Coomassie Brilliant Blue* verwendet. Diese Färbemethode war für diese Arbeit ausreichend empfindlich und wurde zur qualitativen Identifizierung von Proteinen eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in der Färbelösung in der Mikrowelle kurz auf ca. 60 °C erhitzt und danach 20 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gel in der Färbelösung bis zu einer vollständigen Entfärbung des Hintergrundes auf einem Schüttler inkubiert. Gegebenenfalls wurde die Färbelösung ein bis zwei Mal erneuert.

5.3.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

	<i>kDa</i>	<i>1 OD entspricht mg/ml</i>	<i>e (mol⁻¹ cm⁻¹)</i>
<i>STC¹⁻³²⁷</i>	38,0	0,91	34420
<i>α-Thrombin</i>	33,7	1,96	65770
<i>MT-SP1 (katal. Domäne)</i>	26,4	2,03	53560
<i>Fibrinogen</i>	390	1,65	644740

Die Konzentration der Proteine wurde über die Extinktion bestimmt. Mit dem UV-VIS-Spektrometer von Perkin Elmer, Lambda 17, wurde die Extinktion bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen, gemessen und mit Hilfe des Lambert-Beerschen Gesetzes die Konzentration berechnet.

5.4 Expression und Reinigung von *STC¹⁻³²⁷* (mSTC)

STC wurde in *E. coli* BL21(DE3) überexprimiert. Dazu wurden von einer Glycerinkultur in 4 Behältern je 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 180 Upm geschüttelt. Von diesen Kulturen wurden dann viermal je 250 ml LB-Medium mit je 5 ml angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die optische Dichte bei 600 nm nach etwa zwei Stunden einen Wert um 0,5 erreichte, wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-D-Thiogalaktopyranosid) induziert. Danach wurden die Bakterien vier Stunden bei 37 °C, 180 Upm inkubiert und anschließend vereinigt und bei 5000 g, 4 °C, 30 min sedimentiert. Das Sediment wurde in 100 ml Waschpuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 150 mM NaCl) resuspendiert, erneut abzentrifugiert und als Pellet bei -20 °C bis zur Reinigung gelagert.

Die Zellen wurden in Aufschlußpuffer (40 mM HEPES-NaOH pH 8,0; 1 mM EDTA; 100 mM Natriumglutamat; 10% Glycerin) aufgenommen und nach Zugabe von 100 µl einer Lysozym-Lösung (10 mg/ml in Wasser) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Aufschluß erfolgte durch Ultraschall für 5 min mit Pausen, um Überhitzung zu vermeiden. Das Zellysate wurde bei 15000 Upm, 4 °C, für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde aufgehoben und das Prä-

zipitat in 50 ml Aufschlußpuffer resuspendiert. Diese Solubilisierung wurde 6-8 Mal wiederholt und die Reinheit jeder Fraktion mittels SDS-PAGE überprüft. Die Fraktionen, die größtenteils STC enthielten (meist Fraktionen 3-8), wurden vereinigt, 5fach mit Reinigungspuffer (50 mM NaAc-Puffer pH 5,0) verdünnt und auf eine CM-Sepharose-Säule aufgetragen, die mit Äquilibriumspuffer (Reinigungspuffer mit 0,1 M NaCl) voräquiliert war. Nach Waschen mit Äquilibriumspuffer wurde STC mit 400 ml eines linearen Gradienten von 0,1-0,5 M NaCl in diesem Puffer eluiert. Die Reinheit wurde mit SDS-PAGE überprüft. Die vereinigten sauberen Fraktionen wurden gegen 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM NaCl dialysiert, dann zuerst in der Rührzelle und danach mit Centricon-Mikrokonzentratoren bis zu einer Konzentration von 10 mg/ml konzentriert.

5.5 Reinigung von Thrombin

5.5.1 Reinigung aus humanem oder bovinem Plasma

Die Reinigung von bovinem Thrombin erfolgte mit etwa 15-18 l Blut aus einer frisch geschlachteten Kuh. Durch Zentrifugation (30 min, 3000 Upm, 4 °C) wurden anfangs die Zellen aus dem Blut entfernt. Zur Reinigung von humanem Thrombin wurden 3 l gefrorenes menschliches Plasma vom Bayerischen Roten Kreuz, Wiesentheid gekauft.

Nach dem Auftauen wurden 300 ml 0,12 M Na-Citrat pH 6,8; 50 mM Benzamidin-HCl zugegeben, um die Aktivierung der Serinproteinasen und damit Gerinnung zu verhindern. Dieser Lösung wurde langsam und unter Rühren 1 M BaCl₂ bis zu einer Endkonzentration von 80 mM BaCl₂ zugetropft und danach ü.N. bei 4 °C gerührt. Am nächsten Morgen wurde die entstandene Suspension 30 min bei 3000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in Waschpuffer (10 mM BaCl₂; 10 mM Tris-HCl pH 6,8; 100 mM NaCl; 5 mM Benzamidin) gelöst. Dieser Lösungs- und Zentrifugationsschritt wurde 6-8 Mal wiederholt, bis das Pellet klar blieb. Das letzte Pellet wurde in eine Lösung 40% Ammoniumsulfat; 50 mM Tris pH 7,0; 2 mM Benzamidin aufgenommen und ü.N. bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde 30 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde ü.N. gegen Dialysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM Benzamidin; 10 mM EDTA) dialysiert. Am nächsten Morgen wurde die Lösung für 30 min bei 10000 Upm zentrifugiert und dann auf eine Q-Sepharose-Säule aufgetragen, die mit Äquilibriumspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 2 mM Benzamidin) voräquiliert war. Die Elution erfolgte mit einem linearem Gradienten von 150-600 mM NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 2 mM Benzamidin. Der weitaus größte Peak im Chromatogramm entsprach Prothrombin.

5.5.2 Aktivierung

Nach ü.N.-Dialyse gegen 20 mM HEPES-NaOH pH 6,5; 300 mM NaCl wurde der Lösung an Affigel gekoppelte *Oxyuranus scutellatus*-Proteinase zugesetzt. Durch Zugabe von 10 mM CaCl₂ wurde die Reaktion gestartet und deren Fortgang durch SDS-PAGE beobachtet. Nach etwa 4 h war Prothrombin quantitativ in α -Thrombin umgewandelt, woraufhin die Reaktion durch 20 mM EDTA sofort gestoppt wurde. Die Lösung wurde gegen 50 mM Tris-HCl pH 8,0 dialysiert und auf eine Heparin-Sepharose-Säule in diesem Puffer aufgetragen. Mit einem linearen Gradienten von 0-1 M NaCl in 50 mM Tris-HCl pH 8,0 konnte α -Thrombin als einzige Bande auf SDS-PAGE eluiert werden.

5.5.3 Kopplung der Schlangengift-Proteinase an Affigel

10 ml Affigel-10 (Biorad) wurden mit 70 ml Schlangengift-Puffer (20 mM HEPES-NaOH pH 6,5; 300 mM NaCl; 0,01% NaN₃) gewaschen und 100 mg lyophilisiertes *Oxyuranus-scutellatus*-Gift in 25 ml ebendiesem Puffers gelöst. Die Lösungen wurden vereinigt und 4 h bei 4 °C rotiert. Das Affigel wurde abzentrifugiert und freigebliebene Bindestellen mit 1 M Ethanolamin pH 7,5 abgesättigt. Nach erneuter Zentrifugation konnte das Affigel in Schlangengift-Puffer gelagert werden.

5.6 Biochemische Methoden

5.6.1 Analytische Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation wurde in einer Beckman-XL-I-Ultrazentrifuge mit einem Ti60-Rotor durchgeführt. Das Protein wurde auf eine Konzentration von 0,3 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 20 mM NaCl eingestellt und bei 10000 Upm und 4 °C 48 Stunden lang zentrifugiert. Die Auswertung erfolgte mit der mit dem Gerät gelieferten Origin-Software.

5.6.2 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektren wurden mit einem Jasco-J-715-Spektropolarimeter aufgenommen. Bei Fern-UV-Spektren betrug die Proteinkonzentration 0,23 mg/ml in 40 mM Na-Phosphat pH 7,2. Die Spektren wurden in einer Quarzküvette mit 0,1 cm Durchmesser aufgenommen. Thermoübergänge wurden bei einer Heizgeschwindigkeit von 10 °C/h bei einer Wellenlänge von 220 nm aufgezeichnet.

5.6.3 Biacore-Messungen

Die Biacore-Experimente wurden auf einem Biacore-X-System mit manueller Injektion durchgeführt. Fibrinogen wurde über Aminogruppen an einen CM5-Sensorchip gekoppelt. Die Kopplung wurde in Acetat-Puffer pH 4,5 durchgeführt, bis 1000 RU (*response units*) erreicht waren, und durch Blockierung beider Zellen mit 1M Ethanolamin beendet. Die Bindekonstante für den mSTC–Thrombin-Komplex an die Probenzelle wurde bestimmt, indem verschiedene Konzentrationen des Komplexes von 3 nM bis 600 nM injiziert wurden. Um Chipartefakte auszuschließen, wurde die Bindekonstante in Lösung durch ein Konkurrenzexperiment bestimmt. Jeweils 6 nM mSTC–Thrombin-Komplex wurden zusammen mit verschiedenen Fibrinogenkonzentrationen injiziert, die mit dem Fibrinogen der Probenzelle um die mSTC–Thrombin-Bindung konkurrierten.

5.7 Kristallographische Methoden

Da eine Darstellung der Theorie der Röntgenkristallographie den Rahmen dieser Arbeit überschreiten würde, sei auf Lehrbücher und Artikel (Messerschmidt und Huber, 2000; Drenth, 1994; Giacobazzo *et al.*, 1992; Blundell und Johnson, 1976) verwiesen.

Zur Kristallisation wurde die Methode der Dampfdiffusion im hängenden Tropfen angewandt. Die Kristallisationsexperimente wurden in VDX-Platten (Hampton Research, USA) bei 18 °C durchgeführt. Alle Kristallisationslösungen wurden durch Ultrafiltration und / oder Zentrifugation von Schwebstoffen befreit. Das Reservoirvolumen betrug 500 µl. Auf das Deckplättchen wurden 2 µl Proteinlösung und 2 µl Fällungslösung pipettiert und gemischt und danach durch Anpressen die Kammer luftdicht verschlossen.

Um Kristalle des mSTC–Präthrombin-2-Komplexes zu erhalten, wurden kleine Kristalle des mSTC–Thrombin-Komplexes mit einem *loop* aufgenommen und zu einer voräquilibrierten Lösung von mSTC–Präthrombin-2 und Fällungslösung gegeben (*seeding*). Dadurch erhaltene Mischkristalle wurden erneut zum *seeding* eingesetzt, um reine mSTC–Präthrombin-2-Kristalle zu erhalten.

Der Kristall wurde während der Messung pro Bild um einen bestimmten Winkel zwischen 0,2° und 2,0° gedreht. Je nach Raumgruppe mußte dabei ein Gesamtwinkel von 80° bis 180° überstrichen werden, um einen hinreichenden Bereich des reziproken Raumes zu erfassen.

5.7.1 Datensammlung

Die Kristalle wurden entweder direkt aus dem Tropfen, der zuvor mit einem vor dem Gefrieren schützenden Agens (Kryoprotektans, z.B. Butandiol) versetzt wurde, oder nach dem Überführen in einen geeigneten Gefrierpuffer mit einer Nylonschleife aus ihrem Tropfen geho-

ben und in einem Stickstoffstrom bei 100 K schockgefroren. Die Datensammlung erfolgte entweder wie oben beschrieben mit Kupfer-K α -Strahlung ($\lambda=1,54$ Å) oder mit Synchrotronstrahlung am DESY (Deutsches Elektronensynchrotron, HASYLAB) an der *beamline* BW6 (Wiggler-Beamline; variable Wellenlänge) mit einem CCD-Detektor (MarResearch, Hamburg). Der Kristall-Detektor-Abstand betrug zwischen 80 und 300 mm.

5.7.2 Datenauswertung

Die aufgenommenen Diffraktionsbilder wurden mit MOSFLM oder DENZO indiziert und integriert. Die Datenreduktion erfolgte mit den Programmen SCALA und TRUNCATE der CCP4-Programmsammlung (Collaborative Computational Project No. 4 1994) oder SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997).

5.7.2.1 Lösung des Phasenproblems

Die Struktur von STC-Thrombin-PPACK wurde mit der Methode der „Multiplen Anomalen Dispersion“ (MAD) gelöst. Nach der Datenreduktion wurden die Lagen der Schweratome mithilfe der korrekten Positionierung von Thrombin bestimmt. Es war deutlich Elektronendichte für PPACK und das angehängte Quecksilberatom sichtbar. Die Lagen der beiden Quecksilberatome in der asymmetrischen Einheit wurden verwendet, um die experimentellen Phasen mit dem Programm CNS (Brunger *et al.*, 1998) abzuschätzen.

Alle weiteren Strukturen wurden mit Hilfe der Methode des „Molekularen Ersatzes“ gelöst. Es wurde eine Patterson-Suche mit dem Programm AMoRe (Navaza, 2001) und einem oder mehreren dem gesuchten Protein strukturell ähnelnden Suchmodell(en) durchgeführt. Mit Hilfe der Modellkoordinaten wurden dann mit dem Programmpaket CNS Elektronendichtekarten berechnet und die Modelle danach in die Elektronendichte eingepaßt sowie die Primärstruktur korrigiert.

5.7.2.2 Dichtemodifikation / Phasenkombination

Aus der Lage der Schweratome wurden die lokalen Symmetrieoperatoren berechnet und mit CNS optimiert und die Elektronendichte mit CNS in einer Maske gemittelt, die von CNS erzeugt wurde. Die erhaltene solvenskorrigierte Elektronendichte erlaubte die Einpassung einer Helix von STC. Die Modellphasen dieser Helix und der korrekt positionierten Thrombin-Moleküle wurden mit CNS berechnet und für eine Phasenkombination mit den experimentellen MAD-Phasen verwendet. Die dadurch und durch erneute Dichtemodifikation verbesserte Elektronendichte erlaubte den Einbau des fehlenden Teils des STC-Modells.

5.7.3 Modellbau / Verfeinerung

Atomare Modelle wurden mit einer „Octane“-Arbeitsstation (Silicon Graphics, USA) und dem Programm MAIN (Turk, 1992) in die Elektronendichte eingepasst.

Die Verfeinerungen der Atomkoordinaten und Temperaturfaktoren wurden mit CNS durchgeführt. Als Zielfunktion diente das „*maximum-likelihood target*“, bei der anfänglichen Verwendung von experimentellen Phasen (STC) das „*maximum-likelihood Hendrickson-Lattman target*“. Dazu wurden die Parameter von Engh und Huber (1991) verwendet. Außerdem wurde vor jeder Verfeinerung eine „*bulk solvent*“-Korrektur der gemessenen Strukturfaktoramplituden durchgeführt und immer die Reflexe über den gesamten gemessenen Auflösungsbereich für die Verfeinerung verwendet. Beim „*simulated annealing*“ wurde als Starttemperatur 5000 K gewählt und das „*slow cool*“-Protokoll verwendet.

5.7.4 Analyse des Modells

Nach der Verfeinerung wurde die Qualität der Modelle mit den Programmen PROCHECK und WHATIF kontrolliert. Falls in den ausgegebenen Statistiken und Grafiken für eine bestimmte Aminosäure ungewöhnliche ϕ/ψ -Winkel, Torsionswinkel der Seitenkette oder sonstige geometrische Auffälligkeiten auftraten, so wurden diese noch einmal überprüft. Überlagerungen mit anderen Proteinen wurden mit dem Programm TOP durchgeführt.

5.7.5 Graphische Darstellung

Sequenzvergleiche wurden mit dem Programm PILEUP (Wisconsin Package, Genetics Computer Group, USA) erzeugt, manuell an die Strukturdaten angepasst und mit ALSRIPT (Barton, 1993) dargestellt.

Zur graphischen Darstellung von Molekülmodellen wurden die Programme MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), RASTER3D (Merritt und Murphy, 1994) und ViewerLite (<http://www.accelrys.com>) verwendet. Oberflächen wurden mit GRASP (Nicholls *et al.*, 1991) erzeugt und dargestellt.

Zur Nachbearbeitung von Bildern wurde das Programm PHOTOSHOP Version 5.0 (Adobe Systems, USA) oder COREL-DRAW (Corel, Kanada) verwendet.

6 Literatur

- Anderson, PJ; Nasset, A; Dharmawardana, KR und Bock, PE (2000) *Characterization of proexosite I on prothrombin*. J. Biol. Chem. **275**(22): 16428-34.
- Andreasen, PA; Kjoller, L; Christensen, L und Duffy, MJ (1997) *The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: a review*. Int. J. Cancer **72**(1): 1-22.
- Andreasen, PA; Egelund, R und Petersen, HH (2000) *The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis*. Cell. Mol. Life Sci. **57**(1): 25-40.
- Andrews, RK; Lopez, JA und Berndt, MC (1997) *Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation*. Int. J. Biochem. Cell Biol. **29**(1): 91-105.
- Angelides, KJ und Fink, AL (1979) *Mechanism of thiol protease catalysis: detection and stabilization of a tetrahedral intermediate in papain catalysis*. Biochemistry **18**(11): 2363-9.
- Anwar, R und Miloszewski, KJ (1999) *Factor XIII deficiency*. Br. J. Haematol. **107**(3): 468-84.
- Arni, RK; Padmanabhan, K; Padmanabhan, KP; Wu, TP und Tulinsky, A (1994) *Structure of the non-covalent complex of prothrombin kringle 2 with PPACK-thrombin*. Chem. Phys. Lipids **67-68**: 59-66.
- Bach, R; Nemerson, Y und Konigsberg, W (1981) *Purification and characterization of bovine tissue factor*. J. Biol. Chem. **256**(16): 8324-31.
- Bajaj, SP (1999) *Region of factor IXa protease domain that interacts with factor VIIa: analysis of select hemophilia B mutants*. Thromb. Haemost. **82**(2): 218-25.
- Barrett, AJ und Rawlings, ND (1995) *Families and clans of serine peptidases*. Arch. Biochem. Biophys. **318**(2): 247-50.
- Barrett, AJ; Rawlings, ND und Woessner, JF (1998) *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Academic Press, London.
- Bartha, K; Brisson, C; Archipoff, G; de la Salle, C; Lanza, F; Cazenave, JP und Beretz, A (1993) *Thrombin regulates tissue factor and thrombomodulin mRNA levels and activities in human saphenous vein endothelial cells by distinct mechanisms*. J. Biol. Chem. **268**(1): 421-9.
- Barton, G (1993) *An efficient algorithm to locate all locally optimal alignments between two sequences allowing for gaps*. Comput. Appl. Biosci. **9**: 729-34.
- Bauer, KA (1997) *Activation of the factor VII-tissue factor pathway*. Thromb. Haemost. **78**(1): 108-11.
- Benaud, C; Dickson, RB und Lin, CY (2001) *Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood-derived factor*. Eur. J. Biochem. **268**(5): 1439-47.
- Benaud, C; Oberst, M; Hobson, JP; Spiegel, S; Dickson, RB und Lin, CY (2002) *Sphingosine 1-phosphate, present in serum-derived lipoproteins, activates matriptase*. J. Biol. Chem. **277**(12): 10539-46.

- Bergner, A; Muta, T; Iwanaga, S; Beisel, HG; Delotto, R und Bode, W (1997) *Horseshoe crab coagulogen is an invertebrate protein with a nerve growth factor-like domain*. Biol. Chem. **378**(3-4): 283-7.
- Bernard, GR; Vincent, JL; Laterre, PF; LaRosa, SP; Dhainaut, JF; Lopez-Rodriguez, A; Steingrub, JS; Garber, GE; Helterbrand, JD; Ely, EW; Fisher, CJ, Jr. und Recombinant human protein, CWESISsg (2001) *Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis*. N. Engl. J. Med. **344**(10): 699-709.
- Bjorkman, DJ (1998) *The effect of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on prostaglandins*. Am. J. Med. **105**(1B): 8S-12S.
- Blomback, B und Blomback, M (1972) *The molecular structure of fibrinogen*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **202**: 77-97.
- Blow, DM (1968) *Chymotrypsin: tertiary structure and enzymic activity*. Biochem. J. **110**(2): 2P.
- Blundell, TL und Johnson, LN (1976) *Protein Crystallography*. Academic Press, London.
- Bode, W und Schwager, P (1975) *The refined crystal structure of bovine beta-trypsin at 1.8 Å resolution. II. Crystallographic refinement, calcium binding site, benzamidine binding site and active site at pH 7.0*. J. Mol. Biol. **98**(4): 693-717.
- Bode, W und Huber, R (1976) *Induction of the bovine trypsinogen-trypsin transition by peptides sequentially similar to the N-terminus of trypsin*. FEBS Lett. **68**(2): 231-6.
- Bode, W; Schwager, P und Huber, R (1978) *The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. The refined crystal structures of the bovine trypsinogen-pancreatic trypsin inhibitor complex and of its ternary complex with Ile-Val at 1.9 Å resolution*. J. Mol. Biol. **118**(1): 99-112.
- Bode, W (1979) *The transition of bovine trypsinogen to a trypsin-like state upon strong ligand binding. II. The binding of the pancreatic trypsin inhibitor and of isoleucine-valine and of sequentially related peptides to trypsinogen and to p-guanidinobenzoate-trypsinogen*. J. Mol. Biol. **127**(4): 357-74.
- Bode, W; Mayr, I; Baumann, U; Huber, R; Stone, SR und Hofsteenge, J (1989) *The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment*. EMBO J. **8**(11): 3467-75.
- Bode, W; Turk, D und Karshikov, A (1992) *The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships*. Protein Sci. **1**(4): 426-71.
- Bode, W; Grams, F; Reinemer, P; Gomis-Ruth, FX; Baumann, U; McKay, DB und Stocker, W (1996) *The metzincin-superfamily of zinc-peptidases*. Adv. Exp. Med. Biol. **389**: 1-11.
- Booth, NA (1999) *Fibrinolysis and thrombolysis*. Baillieres Clin. Haematol. **12**(3): 423-33.

- Boxrud, PD und Bock, PE (2000) *Streptokinase binds preferentially to the extended conformation of plasminogen through lysine binding site and catalytic domain interactions*. *Biochemistry* **39**(45): 13974-81.
- Boxrud, PD; Fay, WP und Bock, PE (2000) *Streptokinase binds to human plasmin with high affinity, perturbs the plasmin active site, and induces expression of a substrate recognition exosite for plasminogen*. *J. Biol. Chem.* **275**(19): 14579-89.
- Boxrud, PD; Verhamme, IM; Fay, WP und Bock, PE (2001) *Streptokinase triggers conformational activation of plasminogen through specific interactions of the amino-terminal sequence and stabilizes the active zymogen conformation*. *J. Biol. Chem.* **276**(28): 26084-9.
- Brown, JH; Volkmann, N; Jun, G; Henschen-Edman, AH und Cohen, C (2000) *The crystal structure of modified bovine fibrinogen*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**(1): 85-90.
- Brown, MS; Herz, J und Goldstein, JL (1997) *LDL-receptor structure. Calcium cages, acid baths and recycling receptors*. *Nature* **388**(6643): 629-30.
- Broze, GJ, Jr.; Leykam, JE; Schwartz, BD und Miletich, JP (1985) *Purification of human brain tissue factor*. *J. Biol. Chem.* **260**(20): 10917-20.
- Broze, GJ, Jr.; Girard, TJ und Novotny, WF (1990) *Regulation of coagulation by a multivalent Kunitz-type inhibitor*. *Biochemistry* **29**(33): 7539-46.
- Brünger, AT; Adams, PD; Clore, GM; DeLano, WL; Gros, P; Grosse-Kunstleve, RW; Jiang, JS; Kuszewski, J; Nilges, M; Pannu, NS; Read, RJ; Rice, LM; Simonson, T und Warren, GL (1998) *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. *Acta Cryst.* **D54**: 905-21.
- Carmeliet, P; Schoonjans, L; Kieckens, L; Ream, B; Degen, J; Bronson, R; De Vos, R; van den Oord, JJ; Collen, D und Mulligan, RC (1994) *Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice*. *Nature* **368**(6470): 419-24.
- Castellino, FJ; Sodetz, JM; Brockway, WJ und Siefiring, GE, Jr. (1976) *Streptokinase*. *Methods Enzymol.* **45**: 244-57.
- Cederholm-Williams, SA; De Cock, F; Lijnen, HR und Collen, D (1979) *Kinetics of the reactions between streptokinase, plasmin and alpha 2-antiplasmin*. *Eur. J. Biochem.* **100**(1): 125-32.
- Chambers, AF und Matrisian, LM (1997) *Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis*. *J. Natl. Cancer Inst.* **89**(17): 1260-70.
- Chenard, MP; O'Siorain, L; Shering, S; Rouyer, N; Lutz, Y; Wolf, C; Basset, P; Bellocq, JP und Duffy, MJ (1996) *High levels of stromelysin-3 correlate with poor prognosis in patients with breast carcinoma*. *Int. J. Cancer* **69**(6): 448-51.

- Collaborative Computational Project No. 4 (1994) *The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography*. Acta Crystallogr. **D50**, 760-3.
- Collen, D (1980) *On the regulation and control of fibrinolysis. Edward Kowalski Memorial Lecture*. Thromb. Haemost. **43**(2): 77-89.
- Collen, D (1998) *Staphylokinase: a potent, uniquely fibrin-selective thrombolytic agent*. Nat. Med. **4**(3): 279-84.
- Colman, RW (1998) *The contact system: a proinflammatory pathway with antithrombotic activity*. Nat. Med. **4**(3): 277-8.
- Conese, M und Blasi, F (1995) *The urokinase/urokinase-receptor system and cancer invasion*. Baillieres Clin. Haematol. **8**(2): 365-89.
- Coombs, GS; Rao, MS; Olson, AJ; Dawson, PE und Madison, EL (1999) *Revisiting catalysis by chymotrypsin family serine proteases using peptide substrates and inhibitors with unnatural main chains*. J. Biol. Chem. **274**(34): 24074-9.
- Crook, M (1990) *Platelet prothrombinase in health and disease*. Blood Coagul. Fibrinolysis **1**(2): 167-74.
- Cunningham, DF und O'Connor, B (1997) *Proline specific peptidases*. Biochim. Biophys. Acta **1343**(2): 160-86.
- Dang, OD; Vindigni, A und Di Cera, E (1995) *An allosteric switch controls the procoagulant and anticoagulant activities of thrombin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **92**(13): 5977-81.
- Davie, EW (1995) *Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade*. Thromb. Haemost. **74**(1): 1-6.
- Davie, EW und Ratnoff, OD (1964) *Waterfall Sequence for Intrinsic Blood Clotting*. Science **145**: 1310-2.
- Demetri, GD (2001) *Targeted approaches for the treatment of thrombocytopenia*. Oncologist **6**(Suppl 5): 15-23.
- Denda, K; Shimomura, T; Kawaguchi, T; Miyazawa, K und Kitamura, N (2002) *Functional characterization of Kunitz domains in hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1*. J. Biol. Chem. **277**(16): 14053-9.
- di Cera, E; Guinto, ER; Vindigni, A; Dang, QD; Ayala, YM; Wuyi, M und Tulinsky, A (1995) *The Na⁺ binding site of thrombin*. J. Biol. Chem. **270**(38): 22089-92.
- DiMaio, J; Gibbs, B; Munn, D; Lefebvre, J; Ni, F und Konishi, Y (1990) *Bifunctional thrombin inhibitors based on the sequence of hirudin45-65*. J. Biol. Chem. **265**(35): 21698-703.

- DiMaio, J; Gibbs, B; Lefebvre, J; Konishi, Y; Munn, D; Yue, SY und Hornberger, W (1992) *Synthesis of a homologous series of ketomethylene arginyl pseudodipeptides and application to low molecular weight hirudin-like thrombin inhibitors.* J. Med. Chem. **35**(18): 3331-41.
- Dodson, G und Wlodawer, A (1998) *Catalytic triads and their relatives.* Trends Biochem. Sci. **23**(9): 347-52.
- Doggrel, SA (2001) *Alteplase: descendancy in myocardial infarction, ascendancy in stroke.* Expert Opin. Investig. Drugs **10**(11): 2013-29.
- Dolis, D; Moreau, C; Zachowski, A und Devaux, PF (1997) *Aminophospholipid translocase and proteins involved in transmembrane phospholipid traffic.* Biophys. Chem. **68**(1-3): 221-31.
- Donovan, FM; Pike, CJ; Cotman, CW und Cunningham, DD (1997) *Thrombin induces apoptosis in cultured neurons and astrocytes via a pathway requiring tyrosine kinase and RhoA activities.* J. Neurosci. **17**(14): 5316-26.
- Doolittle, RF (1973) *Structural aspects of the fibrinogen to fibrin conversion.* Adv. Protein Chem. **27**: 1-109.
- Doolittle, RF; Watt, KW; Cottrell, BA; Strong, DD und Riley, M (1979) *The amino acid sequence of the alpha-chain of human fibrinogen.* Nature **280**(5722): 464-8.
- Drenth, J (1994) *Principles of Protein X-ray Crystallography.* Springer, New York.
- Egan, D; O'Kennedy, R; Moran, E; Cox, D; Prosser, E und Thornes, RD (1990) *The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds.* Drug Metab. Rev. **22**(5): 503-29.
- Engh, RA und Huber, R (1991) *Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure and refinement.* Acta Cryst. **A47**, 392-400.
- Enyedy, IJ; Lee, SL; Kuo, AH; Dickson, RB; Lin, CY und Wang, S (2001) *Structure-based approach for the discovery of bis-benzamidines as novel inhibitors of matriptase.* J. Med. Chem. **44**(9): 1349-55.
- Esmon, CT und Esmon, NL (1984) *Protein C activation.* Semin. Thromb. Hemost. **10**(2): 122-30.
- Esmon, CT und Lollar, P (1996) *Involvement of thrombin anion-binding exosites 1 and 2 in the activation of factor V and factor VIII.* J. Biol. Chem. **271**(23): 13882-7.
- Esmon, CT (2001) *Sepsis. A myriad of responses.* Lancet **358**(Suppl): S61.
- Falls, LA; Furie, BC; Jacobs, M; Furie, B und Rigby, AC (2001) *The omega-loop region of the human prothrombin gamma-carboxyglutamic acid domain penetrates anionic phospholipid membranes.* J. Biol. Chem. **276**(26): 23895-902.
- Fassina, G; Ferrari, N; Brigati, C; Benelli, R; Santi, L; Noonan, DM und Albini, A (2000) *Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities.* Clin. Exp. Metastasis **18**(2): 111-20.

- Federici, AB und Mannucci, PM (2002) *Advances in the genetics and treatment of von Willebrand disease*. Curr. Opin. Pediatr. **14**(1): 23-33.
- Fenton, JW, 2nd; Olson, TA; Zabinski, MP und Wilner, GD (1988) *Anion-binding exosite of human alpha-thrombin and fibrin(ogen) recognition*. Biochemistry **27**(18): 7106-12.
- Fenton, JW, 2nd; Witting, JI; Pouliott, C und Fareed, J (1989) *Thrombin anion-binding exosite interactions with heparin and various polyanions*. Ann. N. Y. Acad. Sci. **556**: 158-65.
- Folk, JE und Finlayson, JS (1977) *The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases*. Adv. Protein Chem. **31**: 1-133.
- Fonseca, P und Light, A (1983) *The purification and characterization of bovine enterokinase from membrane fragments in the duodenal mucosal fluid*. J. Biol. Chem. **258**(23): 14516-20.
- Frelin, C (1991) *Mechanisms of vasoconstriction*. Am. Heart J. **121**(3 Pt 1): 958-60.
- Fuentes-Prior, P; Iwanaga, Y; Huber, R; Pagila, R; Rumennik, G; Seto, M; Morser, J; Light, DR und Bode, W (2000) *Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex*. Nature **404**(6777): 518-25.
- Furie, B und Furie, BC (1988) *The molecular basis of blood coagulation*. Cell **53**(4): 505-18.
- Furie, BC und Furie, B (1997) *Structure and mechanism of action of the vitamin K-dependent gamma-glutamyl carboxylase: recent advances from mutagenesis studies*. Thromb. Haemost. **78**(1): 595-8.
- Gaboriaud, C; Rossi, V; Fontecillacamps, JC und Arlaud, GJ (1998) *Evolutionary conserved rigid module-domain interactions can be detected at the sequence level - the examples of complement and blood coagulation proteases*. J. Mol. Biol. **282**(2): 459-70.
- Giacovazzo, C; Monaco, HL; Viterbo, D; Scordari, F; Gilli, G; Zanotti, G und Catti, M (1992) *Fundamentals of Crystallography*. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Glickman, MH und Ciechanover, A (2002) *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction [Review]*. Physiol. Rev. **82**(2): 373-428.
- Goguen, JD; Hoe, NP und Subrahmanyam, YV (1995) *Proteases and bacterial virulence: a view from the trenches*. Infect. Agents Dis. **4**(1): 47-54.
- Gonias, SL (1992) *Alpha 2-macroglobulin: a protein at the interface of fibrinolysis and cellular growth regulation*. Exp. Hematol. **20**(3): 302-11.
- Grand, RJ; Turnell, AS und Grabham, PW (1996) *Cellular consequences of thrombin-receptor activation*. Biochem. J. **313**(Pt 2): 353-68.
- Grenier, D (1996) *Degradation of host protease inhibitors and activation of plasminogen by proteolytic enzymes from Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola*. Microbiology **142**(Pt 4): 955-61.

- Hauptmann, J und Stürzebecher, J (1999) *Synthetic inhibitors of thrombin and factor Xa: From bench to bedside [Review]*. Thromb. Res. **93**(5): 203-41.
- Herwald, H; Morgelin, M; Olsen, A; Rhen, M; Dahlback, B; Muller-Esterl, W und Bjorck, L (1998) *Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces—a clue to serious complications in infectious diseases*. Nat. Med. **4**(3): 298-302.
- Hooper, JD; Clements, JA; Quigley, JP und Antalis, TM (2001) *Type II transmembrane serine proteases - Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes [Review]*. J. Biol. Chem. **276**(2): 857-60.
- Hooper, NM (1994) *Families of zinc metalloproteases*. FEBS Lett. **354**(1): 1-6.
- Hubbard, SJ (1998) *The structural aspects of limited proteolysis of native proteins*. Biochim. Biophys. Acta **1382**(2): 191-206.
- Huber, R; Kukla, D; Bode, W; Schwager, P; Bartels, K; Deisenhofer, J und Steigemann, W (1974) *Structure of the complex formed by bovine trypsin and bovine pancreatic trypsin inhibitor. II. Crystallographic refinement at 1.9 Å resolution*. J. Mol. Biol. **89**(1): 73-101.
- Hynes, RO (1992) *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell **69**(1): 11-25.
- Ihara, S; Miyoshi, E; Ko, JH; Murata, K; Nakahara, S; Honke, K; Dickson, RB; Lin, CY und Taniguchi, N (2002) *Prometastatic effect of N-acetylglucosaminyltransferase V is due to modification and stabilization of active matriptase by adding beta 1-6 GlcNAc branching*. J. Biol. Chem. **277**(19): 16960-7.
- Jacquinet, E; Rao, NV; Rao, GV und Hoidal, JR (2000) *Cloning, genomic organization, chromosomal assignment and expression of a novel mosaic serine proteinase: epitheliasin*. FEBS Lett. **468**(1): 93-100.
- Jaspers, L; Lijnen, HR; Vanwetswinkel, S; Van Hoef, B; Brepoels, K; Collen, D und De Maeyer, M (1999) *Guiding a docking mode by phage display: selection of correlated mutations at the staphylokinase-plasmin interface*. J. Mol. Biol. **290**(2): 471-9.
- Johnson, LL; Dyer, R und Hupe, DJ (1998) *Matrix metalloproteinases*. Curr. Opin. Chem. Biol. **2**(4): 466-71.
- Kaida, S; Miyata, T; Yoshizawa, Y; Kawabata, S; Morita, T; Igarashi, H und Iwanaga, S (1987) *Nucleotide sequence of the staphylocoagulase gene: its unique COOH-terminal 8 tandem repeats*. J. Biochem. (Tokyo). **102**(5): 1177-86.
- Kanemitsu, K; Yamamoto, H; Takemura, H; Kaku, M und Shimada, J (2001) *Relatedness between the coagulase gene 3'-end region and coagulase serotypes among Staphylococcus aureus strains*. Microbiol. Immunol. **45**(1): 23-7.
- Karchmer, AW (1985) *Staphylococcal endocarditis. Laboratory and clinical basis for antibiotic therapy*. Am. J. Med. **78**(6B): 116-27.

- Kato, T; Oda, A; Inagaki, Y; Ohashi, H; Matsumoto, A; Ozaki, K; Miyakawa, Y; Watarai, H; Fujii, K; Kokubo, A; Kadoya, T; Ikeda, Y und Miyazaki, H (1997) *Thrombin cleaves recombinant human thrombopoietin: one of the proteolytic events that generates truncated forms of thrombopoietin*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **94**(9): 4669-74.
- Kawabata, S; Morita, T; Iwanaga, S und Igarashi, H (1985a) *Enzymatic properties of staphylothrombin, an active molecular complex formed between staphylocoagulase and human prothrombin*. J. Biochem. (Tokyo). **98**(6): 1603-14.
- Kawabata, S; Morita, T; Iwanaga, S und Igarashi, H (1985b) *Difference in enzymatic properties between alpha-thrombin-staphylocoagulase complex and free alpha-thrombin*. J. Biochem. (Tokyo). **97**(4): 1073-8.
- Kawabata, S; Morita, T; Miyata, T; Iwanaga, S und Igarashi, H (1986) *Isolation and characterization of staphylocoagulase chymotryptic fragment. Localization of the procoagulant- and prothrombin-binding domain of this protein*. J. Biol. Chem. **261**(3): 1427-33.
- Kawabata, S und Iwanaga, S (1994) *Structure and function of staphylothrombin*. Semin. Thromb. Hemost. **20**(4): 345-50.
- Kaye, D (1985) *Infective endocarditis. An overview*. Am. J. Med. **78**(6B): 107-9.
- Kazama, Y; Hamamoto, T; Foster, DC und Kisiel, W (1995) *Hepsin, a putative membrane-associated serine protease, activates human factor VII and initiates a pathway of blood coagulation on the cell surface leading to thrombin formation*. J. Biol. Chem. **270**(1): 66-72.
- Keller, P und Simons, K (1997) *Post-Golgi biosynthetic trafficking*. J. Cell Sci. **110**(Pt 24): 3001-9.
- Kim, DM; Lee, SJ; Kim, IC; Kim, ST und Byun, SM (2000) *Asp41-His48 region of streptokinase is important in binding to a substrate plasminogen*. Thromb. Res. **99**(1): 93-8.
- Kim, J; Yu, W; Kovalski, K und Ossowski, L (1998) *Requirement for specific proteases in cancer cell intravasation as revealed by a novel semiquantitative PCR-based assay*. Cell **94**(3): 353-62.
- Kim, MG; Chen, C; Lyu, MS; Cho, EG; Park, D; Kozak, C und Schwartz, RH (1999) *Cloning and chromosomal mapping of a gene isolated from thymic stromal cells encoding a new mouse type II membrane serine protease, epithin, containing four LDL receptor modules and two CUB domains*. Immunogenetics **49**(5): 420-8.
- Kim, SH; Chun, HS; Han, MH; Park, NY und Suk, K (1997) *A novel variant of staphylokinase gene from Staphylococcus aureus ATCC 29213*. Thromb. Res. **87**(4): 387-95.
- Kisiel, W; Canfield, WM; Ericsson, LH und Davie, EW (1977) *Anticoagulant properties of bovine plasma protein C following activation by thrombin*. Biochemistry **16**(26): 5824-31.

- Kitamoto, Y; Yuan, X; Wu, Q; McCourt, DW und Sadler, JE (1994) *Enterokinase, the initiator of intestinal digestion, is a mosaic protease composed of a distinctive assortment of domains*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **91**(16): 7588-92.
- Kitamoto, Y; Veile, RA; Donis-Keller, H und Sadler, JE (1995) *cDNA sequence and chromosomal localization of human enterokinase, the proteolytic activator of trypsinogen*. Biochemistry **34**(14): 4562-8.
- Kitt, AJ und Leigh, JA (1997) *The auxotrophic nature of Streptococcus uberis. The acquisition of essential acids from plasmin derived casein peptides*. Adv. Exp. Med. Biol. **418**: 647-50.
- Korzeniowski, OM und Kaye, D (1992) *Infective Endocarditis*. In: *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*, 1078-105. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Koshelnick, Y; Ehart, M; Hufnagl, P; Heinrich, PC und Binder, BR (1997) *Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598*. J. Biol. Chem. **272**(45): 28563-7.
- Kramer, RA; Vandeputte-Rutten, L; de Roon, GJ; Gros, P; Dekker, N und Egmond, MR (2001) *Identification of essential acidic residues of outer membrane protease OmpT supports a novel active site*. FEBS Lett. **505**(3): 426-30.
- Kraulis, P (1991) *MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures*. J. Appl. Crystallogr. **24**: 946-50.
- Kraut, J (1977) *Serine proteases: structure and mechanism of catalysis*. Annu. Rev. Biochem. **46**: 331-58.
- Krem, MM und di Cera, E (2002) *Evolution of enzyme cascades from embryonic development to blood coagulation*. Trends Biochem. Sci. **27**(2): 67-74.
- Krstenansky, JL; Broersma, RJ; Owen, TJ; Payne, MH; Yates, MT und Mao, SJ (1990) *Development of MDL 28,050, a small stable antithrombin agent based on a functional domain of the leech protein, hirudin*. Thromb. Haemost. **63**(2): 208-14.
- Kukkonen, M; Lahteenmaki, K; Suomalainen, M; Kalkkinen, N; Emody, L; Lang, H und Korhonen, TK (2001) *Protein regions important for plasminogen activation and inactivation of alpha2-antiplasmin in the surface protease Pla of Yersinia pestis*. Mol. Microbiol. **40**(5): 1097-111.
- Kute, TE; Grondahl-Hansen, J; Shao, SM; Long, R; Russell, G und Brunner, N (1998) *Low cathepsin D and low plasminogen activator type 1 inhibitor in tumor cytosols defines a group of node negative breast cancer patients with low risk of recurrence*. Breast Cancer Res. Treat. **47**(1): 9-16.
- Laemmli, UK (1970) *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature. **227**(259): 680-5.

- Lee, C (1999) *Recombinant clotting factors in the treatment of hemophilia*. *Thromb. Haemost.* **82**(2): 516-24.
- Lee, SL; Dickson, RB und Lin, CY (2000) *Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease*. *J. Biol. Chem.* **275**(47): 36720-5.
- Leslie, A (1991) *Macromolecular Data Processing*. In: Moras, D; Podjarny, AD und Thierry, JC (Editoren) *Crystallographic Computing V*, 27–38. Oxford University Press, Oxford.
- Levi, M; de Jonge, E; van der Poll, T und ten Cate, H (2000) *Novel approaches to the management of disseminated intravascular coagulation*. *Crit. Care Med.* **28**(9 Suppl): S20-4.
- Levi, M; de Jonge, E und van der Poll, T (2001) *Rationale for restoration of physiological anticoagulant pathways in patients with sepsis and disseminated intravascular coagulation*. *Crit. Care Med.* **29**(7 Suppl): S90-4.
- Lijnen, HR und Collen, D (1985) *Protease inhibitors of human plasma. Alpha-2-antiplasmin*. *J. Med.* **16**(1-3): 225-84.
- Lijnen, HR; De Cock, F; Van Hoef, B; Schlott, B und Collen, D (1994) *Characterization of the interaction between plasminogen and staphylokinase*. *Eur. J. Biochem.* **224**(1): 143-9.
- Lin, CY; Anders, J; Johnson, M und Dickson, RB (1999a) *Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk*. *J. Biol. Chem.* **274**(26): 18237-42.
- Lin, CY; Anders, J; Johnson, M; Sang, QXA und Dickson, RB (1999b) *Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity*. *J. Biol. Chem.* **274**(26): 18231-6.
- Liotta, LA (1992) *Cancer cell invasion and metastasis*. *Sci. Am.* **266**(2): 54-9, 62-3.
- List, K; Haudenschild, CC; Szabo, R; Chen, WJ; Wahl, SM; Swaim, W; Engelholm, LH; Behrendt, N und Bugge, TH (2002) *Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis*. *Oncogene* **21**(23): 3765-79.
- Long, YQ; Lee, SL; Lin, CY; Enyedy, IJ; Wang, SM; Li, P; Dickson, RB und Roller, PP (2001) *Synthesis and evaluation of the sunflower derived trypsin inhibitor as a potent inhibitor of the type II transmembrane serine protease, matriptase*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **11**(18): 2515-9.
- Lu, D; Yuan, X; Zheng, X und Sadler, JE (1997) *Bovine proenteropeptidase is activated by trypsin, and the specificity of enteropeptidase depends on the heavy chain*. *J. Biol. Chem.* **272**(50): 31293-300.

- Lu, D; Futterer, K; Korolev, S; Zheng, X; Tan, K; Waksman, G und Sadler, JE (1999) *Crystal structure of enteropeptidase light chain complexed with an analog of the trypsinogen activation peptide*. J. Mol. Biol. **292**(2): 361-73.
- Lundrigan, MD und Webb, RM (1992) *Prevalence of ompT among Escherichia coli isolates of human origin*. FEMS Microbiol. Lett. **76**(1-2): 51-6.
- Lynn, WA und Cohen, J (1995) *Adjunctive therapy for septic shock: a review of experimental approaches*. Clin. Infect. Dis. **20**(1): 143-58.
- Machovich, R und Owen, WG (1990) *The elastase-mediated pathway of fibrinolysis*. Blood Coagul. Fibrinolysis **1**(1): 79-90.
- Madison, EL; Kobe, A; Gething, MJ; Sambrook, JF und Goldsmith, EJ (1993) *Converting tissue plasminogen activator to a zymogen: a regulatory triad of Asp-His-Ser*. Science **262**(5132): 419-21.
- Malke, H (1993) *Polymorphism of the streptokinase gene: implications for the pathogenesis of post-streptococcal glomerulonephritis*. Int. J. Med. Microbiol. **278**(2-3): 246-57.
- Malke, H; Steiner, K; Gase, K und Frank, C (2000) *Expression and regulation of the streptokinase gene*. Methods (Duluth) **21**(2): 111-24.
- Mangel, WF; Toledo, DL; Brown, MT; Worzalla, K; Lee, M und Dunn, JJ (1994) *OmpT: an Escherichia coli outer membrane proteinase that activates plasminogen*. Methods Enzymol. **244**: 384-99.
- Mann, KG; Nesheim, ME; Church, WR; Haley, P und Krishnaswamy, S (1990) *Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes*. Blood **76**(1): 1-16.
- Maquoi, E; Noel, A; Frankenne, F; Angliker, H; Murphy, G und Foidart, JM (1998) *Inhibition of matrix metalloproteinase 2 maturation and HT1080 invasiveness by a synthetic furin inhibitor*. FEBS Lett. **424**(3): 262-6.
- Maraganore, JM; Bourdon, P; Jablonski, J; Ramachandran, KL und Fenton, JW, 2nd (1990) *Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin*. Biochemistry **29**(30): 7095-101.
- Markwardt, F; Schafer, G; Topfer, H und Walsmann, P (1967) *[Isolation of hirudin from medicinal leech]*. Pharmazie **22**(5): 239-41.
- Mathews, II; Vanderhoff-Hanaver, P; Castellino, FJ und Tulinsky, A (1996) *Crystal structures of the recombinant kringle 1 domain of human plasminogen in complexes with the ligands epsilon-aminocaproic acid and trans-4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carboxylic Acid*. Biochemistry **35**(8): 2567-76.
- Matthews, BW; Sigler, PB; Henderson, R und Blow, DM (1967) *Three-dimensional structure of tosyl-alpha-chymotrypsin*. Nature **214**(89): 652-6.

- Maynard, JR; Heckman, CA; Pitlick, FA und Nemerson, Y (1975) *Association of tissue factor activity with the surface of cultured cells*. J. Clin. Invest. **55**(4): 814-24.
- Maynard, JR; Dreyer, BE; Stemerman, MB und Pitlick, FA (1977) *Tissue-factor coagulant activity of cultured human endothelial and smooth muscle cells and fibroblasts*. Blood **50**(3): 387-96.
- McCawley, LJ und Matrisian, LM (2001) *Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!* Curr. Opin. Cell Biol. **13**(5): 534-40.
- McDevitt, D; Vaudaux, P und Foster, TJ (1992) *Genetic evidence that bound coagulase of Staphylococcus aureus is not clumping factor*. Infect. Immun. **60**(4): 1514-23.
- McFarlane, RG (1964) *An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier*. Nature **202**: 498-9.
- Merritt, E und Murphy, M (1994) *Raster3D Version 2.0. A program for photorealistic molecular graphics*. Acta Cryst. **D50**: 869-73.
- Messerschmidt, A und Huber, R (2000) *X-ray crystallography of Biological Macromolecules*. In: Meyers, R (Editor) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 6061-107. Wiley, Chichester.
- Moncada, S und Vane, JR (1979) *Mode of action of aspirin-like drugs*. Adv. Intern. Med. **24**: 1-22.
- Monkovic, DD und Tracy, PB (1990) *Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin*. J. Biol. Chem. **265**(28): 17132-40.
- Montgomery, AM; De Clerck, YA; Langley, KE; Reissfeld, RA und Mueller, BM (1993) *Melanoma-mediated dissolution of extracellular matrix: contribution of urokinase-dependent and metalloproteinase-dependent proteolytic pathways*. Cancer Res. **53**(3): 693-700.
- Moreillon, P; Entenza, JM; Francioli, P; McDevitt, D; Foster, TJ; Francois, P und Vaudaux, P (1995) *Role of Staphylococcus aureus coagulase and clumping factor in pathogenesis of experimental endocarditis*. Infect. Immun. **63**(12): 4738-43.
- Morita, T; Kawabata, S; Iwanaga, S und Igarashi, H (1982) *[Activation mechanism of human prothrombin by staphylocoagulase]*. Rinsho Byori - Japanese J. Clin. Pathol. **Suppl**(50): 127-36.
- Myles, T; Le Bonniec, BF und Stone, SR (2001) *The dual role of thrombin's anion-binding exosite-I in the recognition and cleavage of the protease-activated receptor 1*. Eur. J. Biochem. **268**(1): 70-7.
- Naski, MC; Lorand, L und Shafer, JA (1991) *Characterization of the kinetic pathway for fibrin promotion of alpha-thrombin-catalyzed activation of plasma factor XIII*. Biochemistry **30**(4): 934-41.
- Navaza, J (2001) *Implementation of molecular replacement in AMoRe*. Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography **57**(Pt 10): 1367-72.
- Nelsestuen, GL; Kisiel, W und Di Scipio, RG (1978) *Interaction of vitamin K dependent proteins with membranes*. Biochemistry **17**(11): 2134-8.

- Nemerson, Y und Bach, R (1982) *Tissue factor revisited*. Prog. Hemost. Thromb. **6**: 237-61.
- Nemerson, Y und Gentry, R (1986) *An ordered addition, essential activation model of the tissue factor pathway of coagulation: evidence for a conformational cage*. Biochemistry **25**(14): 4020-33.
- Nesheim, ME und Mann, KG (1979) *Thrombin-catalyzed activation of single chain bovine factor V*. J. Biol. Chem. **254**(4): 1326-34.
- Nicholls, A; Sharp, KA und Honig, B (1991) *Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons*. Proteins **11**: 281-96.
- Nienaber, V; Wang, JY; Davidson, D und Henkin, J (2000) *Re-engineering of human urokinase provides a system for structure-based drug design at high resolution and reveals a novel structural subsite*. J. Biol. Chem. **275**(10): 7239-48.
- Noel, A; Gilles, C; Bajou, K; Devy, L; Kebers, F; Lewalle, JM; Maquoi, E; Munaut, C; Remacle, A und Foidart, JM (1997) *Emerging roles for proteinases in cancer*. Invasion Metastasis **17**(5): 221-39.
- Nykjaer, A; Conese, M; Christensen, EI; Olson, D; Cremona, O; Gliemann, J und Blasi, F (1997) *Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes*. EMBO J. **16**(10): 2610-20.
- Oberst, M; Anders, J; Xie, B; Singh, B; Ossandon, M; Johnson, M; Dickson, RB und Lin, CY (2001) *Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo*. Am. J. Pathol. **158**(4): 1301-11.
- Oberst, MD; Johnson, MD; Dickson, RB; Lin, CY; Singh, B; Stewart, M; Williams, A; al-Nafussi, A; Smyth, JF; Gabra, H und Sellar, GC (2002) *Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: Correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters*. Clin. Cancer Res. **8**(4): 1101-7.
- Okada, K; Lijnen, HR; Moreau, H; Vanderschueren, S und Collen, D (1996a) *Procoagulant properties of intravenous staphylokinase versus tissue-type plasminogen activator*. Thromb. Haemost. **76**(6): 857-9.
- Okada, K; Ueshima, S; Takaishi, T; Yuasa, H; Fukao, H und Matsuo, O (1996b) *Effects of fibrin and alpha2-antiplasmin on plasminogen activation by staphylokinase*. Am. J. Hematol. **53**(3): 151-7.
- Otwinowski, Z und Minor, W (1997) *Processing of X-Ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. Methods Enzymol. **276**: 307-26.
- Padmanabhan, K; Padmanabhan, KP; Tulinsky, A; Park, CH; Bode, W; Huber, R; Blankenship, DT; Cardin, AD und Kisiel, W (1993) *Structure of human des(1-45) factor Xa at 2.2 Å resolution*. J. Mol. Biol. **232**(3): 947-66.

- Palma, M; Wade, D; Flock, M und Flock, JI (1998) *Multiple binding sites in the interaction between an extracellular fibrinogen-binding protein from Staphylococcus aureus and fibrinogen*. J. Biol. Chem. **273**(21): 13177-81.
- Parry, MA; Stone, SR; Hofsteenge, J und Jackman, MP (1993) *Evidence for common structural changes in thrombin induced by active-site or exosite binding*. Biochem. J. **290**(Pt 3): 665-70.
- Parry, MA; Fernandez-Catalan, C; Bergner, A; Huber, R; Hopfner, KP; Schlott, B; Guhrs, KH und Bode, W (1998) *The ternary microplasmin-staphylokinase-microplasmin complex is a proteinase-cofactor-substrate complex in action*. Nat. Struct. Biol. **5**(10): 917-23.
- Parry, MAA; Zhang, XC und Bode, W (2000) *Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues [Review]*. Trends Biochem. Sci. **25**(2): 53-9.
- Pillay, CS; Elliott, E und Dennison, C (2002) *Endolysosomal proteolysis and its regulation [Review]*. Biochem. J. **363**(Part 3): 417-29.
- Polgar, L (1974) *Mercaptide-imidazolium ion-pair: the reactive nucleophile in papain catalysis*. FEBS Lett. **47**(1): 15-8.
- Polgar, L (1987) *The mechanism of action of aspartic proteases involves 'push-pull' catalysis*. FEBS Lett. **219**(1): 1-4.
- Primakoff, P und Myles, DG (2000) *The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity*. Trends Genet. **16**(2): 83-7.
- Puyo, CA (2001) *Thrombocytopenia*. Int. Anesthesiol. Clin. **39**(1): 17-34.
- Qiu, X; Padmanabhan, KP; Carperos, VE; Tulinsky, A; Kline, T; Maraganore, JM und Fenton, JW, 2nd (1992) *Structure of the hirulog 3-thrombin complex and nature of the S' subsites of substrates and inhibitors*. Biochemistry **31**(47): 11689-97.
- Rabijns, A; De Bondt, HL und De Ranter, C (1997) *Three-dimensional structure of staphylokinase, a plasminogen activator with therapeutic potential*. Nat. Struct. Biol. **4**(5): 357-60.
- Rawlings, ND und Barrett, AJ (1994) *Families of cysteine peptidases*. Methods Enzymol. **244**: 461-86.
- Rawlings, ND und Barrett, AJ (1995) *Families of aspartic peptidases, and those of unknown catalytic mechanism*. Methods Enzymol. **248**: 105-20.
- Rehse, PH; Steinmetzer, T; Li, Y; Konishi, Y und Cygler, M (1995) *Crystal structure of a peptidyl pyridinium methyl ketone inhibitor with thrombin*. Biochemistry **34**(36): 11537-44.
- Richardson, JL; Kroger, B; Hoeffken, W; Sadler, JE; Pereira, P; Huber, R; Bode, W und Fuentes-Prior, P (2000) *Crystal structure of the human alpha-thrombin-haemadin complex: an exosite II-binding inhibitor*. EMBO J. **19**(21): 5650-60.

- Roberts, HR (1991) *Factor VIII replacement therapy. Issues and future prospects.* Ann. N. Y. Acad. Sci. **614**: 106-13.
- Roberts, HR (1993) *Molecular biology of hemophilia B.* Thromb. Haemost. **70**(1): 1-9.
- Robertus, JD; Kraut, J; Alden, RA und Birktoft, JJ (1972) *Subtilisin; a stereochemical mechanism involving transition-state stabilization.* Biochemistry **11**(23): 4293-303.
- Rogers, SJ; Pratt, CW; Whinna, HC und Church, FC (1992) *Role of thrombin exosites in inhibition by heparin cofactor II.* J. Biol. Chem. **267**(6): 3613-7.
- Rosenberg, RD und Damus, PS (1973) *The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor.* J. Biol. Chem. **248**(18): 6490-505.
- Rosey, EL; Lincoln, RA; Ward, PN; Yancey, RJ, Jr. und Leigh, JA (1999) *PauA: a novel plasminogen activator from Streptococcus uberis.* FEMS Microbiol. Lett. **178**(1): 27-33.
- Ruggeri, ZM (2001) *Structure of von Willebrand factor and its function in platelet adhesion and thrombus formation.* Baillieres Clin. Haematol. **14**(2): 257-79.
- Rydel, TJ; Tulinsky, A; Bode, W und Huber, R (1991) *Refined structure of the hirudin-thrombin complex.* J. Mol. Biol. **221**(2): 583-601.
- Saenko, EL; Shima, M und Sarafanov, AG (1999) *Role of activation of the coagulation factor VIII in interaction with vWf, phospholipid, and functioning within the factor Xase complex.* Trends Cardiovasc. Med. **9**(7): 185-92.
- Saito, H (1980) *The participation of plasma thromboplastin antecedent (Factor XI) in contact-activated fibrinolysis.* Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **164**(2): 153-7.
- Sakharov, DV; Lijnen, HR und Rijken, DC (1996) *Interactions between staphylokinase, plasmin(ogen), and fibrin. Staphylokinase discriminates between free plasminogen and plasminogen bound to partially degraded fibrin.* J. Biol. Chem. **271**(44): 27912-8.
- Savage, B; Cattaneo, M und Ruggeri, ZM (2001) *Mechanisms of platelet aggregation.* Curr. Opin. Hematol. **8**(5): 270-6.
- Sawicka-Grzelak, A; Szymanowska, A; Mlynarczyk, A und Mlynarczyk, G (1993) *[Production of staphylokinase and hemolysin by coagulase-negative staphylococcus].* Med. Dosw. Mikrobiol. **45**(1): 7-10.
- Schechter, I und Berger, A (1967) *On the size of the active site in proteases. I. Papain.* Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**(2): 157-62.
- Scheiflinger, F und Dorner, F (1999) *Recent advances in the understanding of the molecular biology of hemophilia A: possible implications towards a more effective therapeutic regime.* Wien. Klin. Wochenschr. **111**(5): 172-80.

- Schlott, B; Guhrs, KH; Hartmann, M; Rocker, A und Collen, D (1998) *NH₂-terminal structural motifs in staphylokinase required for plasminogen activation*. J. Biol. Chem. **273**(35): 22346-50.
- Schmaier, AH (2000) *Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions*. Curr. Opin. Hematol. **7**(5): 261-5.
- Schmitt, M; Wilhelm, O; Janicke, F; Magdolen, V; Reuning, U; Ohi, H; Moniwa, N; Kobayashi, H; Weidle, U und Graeff, H (1995) *Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its receptor (CD87): a new target in tumor invasion and metastasis*. J. Obstet. Gynaecol. **21**(2): 151-65.
- Seiki, M (1999) *Membrane-type matrix metalloproteinases*. APMIS **107**(1): 137-43.
- Shi, GY; Chang, BI; Chen, SM; Wu, DH und Wu, HL (1994) *Function of streptokinase fragments in plasminogen activation*. Biochem. J. **304**(Pt 1): 235-41.
- Shi, YE; Torri, J; Yieh, L; Wellstein, A; Lippman, ME und Dickson, RB (1993) *Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells*. Cancer Res. **53**(6): 1409-15.
- Shimomura, T; Denda, K; Kitamura, A; Kawaguchi, T; Kito, M; Kondo, J; Kagaya, S; Qin, L; Takata, H; Miyazawa, K und Kitamura, N (1997) *Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor*. J. Biol. Chem. **272**(10): 6370-6.
- Shimomura, T; Denda, K; Kawaguchi, T; Matsumoto, K; Miyazawa, K und Kitamura, N (1999) *Multiple sites of proteolytic cleavage to release soluble forms of hepatocyte growth factor activator inhibitor type I from a transmembrane form*. J. Biochem. (Tokyo). **126**(5): 821-8.
- Sidelmann, JJ; Gram, J; Jespersen, J und Kluft, C (2000) *Fibrin clot formation and lysis: basic mechanisms*. Semin. Thromb. Hemost. **26**(6): 605-18.
- Sigler, PB; Blow, DM; Matthews, BW und Henderson, R (1968) *Structure of crystalline -chymotrypsin. II. A preliminary report including a hypothesis for the activation mechanism*. J. Mol. Biol. **35**(1): 143-64.
- Silence, K; Hartmann, M; Guhrs, KH; Gase, A; Schlott, B; Collen, D und Lijnen, HR (1995) *Structure-function relationships in staphylokinase as revealed by "clustered charge to alanine" mutagenesis*. J. Biol. Chem. **270**(45): 27192-8.
- Skrzypczak-Jankun, E; Carperos, VE; Ravichandran, KG; Tulinsky, A; Westbrook, M und Manganore, JM (1991) *Structure of the hirugen and hirulog 1 complexes of alpha-thrombin*. J. Mol. Biol. **221**(4): 1379-93.
- Smith, BJ (1999) *Thrombolysis in acute myocardial infarction: analysis of studies comparing accelerated t-PA and streptokinase*. J. Accid. Emerg. Med. **16**(6): 407-11.

- Sodeinde, OA und Goguen, JD (1988) *Genetic analysis of the 9.5-kilobase virulence plasmid of Yersinia pestis*. Infect. Immun. **56**(10): 2743-8.
- Sodeinde, OA und Goguen, JD (1989) *Nucleotide sequence of the plasminogen activator gene of Yersinia pestis: relationship to ompT of Escherichia coli and gene E of Salmonella typhimurium*. Infect. Immun. **57**(5): 1517-23.
- Sodeinde, OA; Subrahmanyam, YV; Stark, K; Quan, T; Bao, Y und Goguen, JD (1992) *A surface protease and the invasive character of plague*. Science **258**(5084): 1004-7.
- Soulier, JP (1967) [*Staphylocoagulase*]. Rev. Fr. Etud. Clin. Biol. **12**(6): 523-6.
- Steinmetzer, T; Renatus, M; Kunzel, S; Eichinger, A; Bode, W; Wikstrom, P; Hauptmann, J und Stürzebecher, J (1999a) *Design and evaluation of novel bivalent thrombin inhibitors based on amidinophenylalanines*. Eur. J. Biochem. **265**(2): 598-605.
- Steinmetzer, T; Zhu, BY und Konishi, Y (1999b) *Potent bivalent thrombin inhibitors: Replacement of the scissile peptide bond at P-1-P-1' with arginyl ketomethylene isosteres*. J. Med. Chem. **42**(16): 3109-15.
- Steinmetzer, T; Batdordshjin, M; Pineda, F; Seyfarth, L; Vogel, A; Reissmann, S; Hauptmann, J und Stürzebecher, J (2000) *New bivalent thrombin inhibitors with N-alpha(methyl)arginine at the P1-position*. Biol. Chem. **381**(7): 603-10.
- Steinmetzer, T; Hauptmann, J und Stürzebecher, J (2001) *Advances in the development of thrombin inhibitors [Review]*. Expert Opin. Investig. Drugs **10**(5): 845-64.
- Stenflo, J (1999) *Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors*. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. **9**(1): 59-88.
- Stenflo, J; Stenberg, Y und Muranyi, A (2000) *Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions*. Biochim. Biophys. Acta **1477**(1-2): 51-63.
- Stöcker, W und Bode, W (1995) *Structural features of a superfamily of zinc-endopeptidases: the metzincins*. Curr. Opin. Struct. Biol. **5**(3): 383-90.
- Stone, AL; Kroeger, M und Sang, QX (1999) *Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review)*. J. Protein Chem. **18**(4): 447-65.
- Stroud, RM; Kossiakoff, AA und Chambers, JL (1977) *Mechanisms of zymogen activation*. Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **6**: 177-93.
- Stubbs, MT; Oschkinat, H; Mayr, I; Huber, R; Angliker, H; Stone, SR und Bode, W (1992) *The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity*. Eur. J. Biochem. **206**(1): 187-95.
- Stubbs, MT und Bode, W (1994) *Coagulation factors and their inhibitors*. Curr. Opin. Struct. Biol. **4**(6): 823-32.

- Stubbs, MT; Huber, R und Bode, W (1995) *Crystal structures of factor Xa specific inhibitors in complex with trypsin: structural grounds for inhibition of factor Xa and selectivity against thrombin*. FEBS Lett. **375**(1-2): 103-7.
- Takeuchi, T; Shuman, MA und Craik, CS (1999) *Reverse biochemistry: use of macromolecular protease inhibitors to dissect complex biological processes and identify a membrane-type serine protease in epithelial cancer and normal tissue*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **96**(20): 11054-61.
- Takeuchi, T; Harris, JL; Huang, W; Yan, KW; Coughlin, SR und Craik, CS (2000) *Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates*. J. Biol. Chem. **275**(34): 26333-42.
- Tang, J; James, MN; Hsu, IN; Jenkins, JA und Blundell, TL (1978) *Structural evidence for gene duplication in the evolution of the acid proteases*. Nature **271**(5646): 618-21.
- Thompson, RE; Mandle, R, Jr. und Kaplan, AP (1977) *Association of factor XI and high molecular weight kininogen in human plasma*. J. Clin. Invest. **60**(6): 1376-80.
- Tollefsen, DM; Majerus, DW und Blank, MK (1982) *Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma*. J. Biol. Chem. **257**(5): 2162-9.
- Tracy, PB; Nesheim, ME und Mann, KG (1981) *Coordinate binding of factor Va and factor Xa to the unstimulated platelet*. J. Biol. Chem. **256**(2): 743-51.
- Travis, J; Potempa, J und Maeda, H (1995) *Are bacterial proteinases pathogenic factors?* Trends Microbiol. **3**(10): 405-7.
- Tsuda, Y; Cygler, M; Gibbs, BF; Pedyczak, A; Fethiere, J; Yue, SY und Konishi, Y (1994) *Design of potent bivalent thrombin inhibitors based on hirudin sequence: incorporation of nonsubstrate-type active site inhibitors*. Biochemistry **33**(48): 14443-51.
- Turk, D (1992) *Weiterentwicklung eines Programms für Molekülgraphik und Elektronendichte-Manipulation und seine Anwendung auf verschiedene Protein-Strukturaufklärungen*. Doktorarbeit, Technische Universität, München.
- van de Locht, A; Stubbs, MT; Bode, W; Friedrich, T; Bollschweiler, C; Hoffken, W und Huber, R (1996) *The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma?* EMBO J. **15**(22): 6011-7.
- van de Locht, A; Bode, W; Huber, R; Le Bonniec, BF; Stone, SR; Esmo, CT und Stubbs, MT (1997) *The thrombin E192Q-BPTI complex reveals gross structural rearrangements: implications for the interaction with antithrombin and thrombomodulin*. EMBO J. **16**(11): 2977-84.

- Vandeputte-Rutten, L; Kramer, RA; Kroon, J; Dekker, N; Egmond, MR und Gros, P (2001) *Crystal structure of the outer membrane protease OmpT from Escherichia coli suggests a novel catalytic site.* EMBO J. **20**(18): 5033-9.
- Vehar, GA und Davie, EW (1980) *Preparation and properties of bovine factor VIII (antihemophilic factor).* Biochemistry **19**(3): 401-10.
- Verhamme, IM; Olson, ST; Tollefsen, DM und Bock, PE (2002) *Binding of exosite ligands to human thrombin. Re-evaluation of allosteric linkage between thrombin exosites I and II.* J. Biol. Chem. **277**(9): 6788-98.
- Vinazzer, H (1999) *Hereditary and acquired antithrombin deficiency.* Semin. Thromb. Hemost. **25**(3): 257-63.
- Vu, TKH; Liu, RW; Haaksma, CJ; Tomasek, JJ und Howard, EW (1997) *Identification and cloning of the membrane-associated serine protease, hepsin, from mouse preimplantation embryos.* J. Biol. Chem. **272**(50): 31315-20.
- Walker, FJ (1980) *Regulation of activated protein C by a new protein. A possible function for bovine protein S.* J. Biol. Chem. **255**(12): 5521-4.
- Wallrapp, C; Hahnel, S; Muller-Pillasch, F; Burghardt, B; Iwamura, T; Ruthenburger, M; Lerch, MM; Adler, G und Gress, TM (2000) *A novel transmembrane serine protease (TMPRSS3) overexpressed in pancreatic cancer.* Cancer Res. **60**(10): 2602-6.
- Wang, S; Reed, GL und Hedstrom, L (1999) *Deletion of Ile1 changes the mechanism of streptokinase: evidence for the molecular sexuality hypothesis.* Biochemistry **38**(16): 5232-40.
- Wang, S; Reed, GL und Hedstrom, L (2000) *Zymogen activation in the streptokinase-plasminogen complex. Ile1 is required for the formation of a functional active site.* Eur. J. Biochem. **267**(13): 3994-4001.
- Wang, X; Lin, X; Loy, JA; Tang, J und Zhang, XC (1998) *Crystal structure of the catalytic domain of human plasmin complexed with streptokinase.* Science **281**(5383): 1662-5.
- Weissbach, L und Grieninger, G (1990) *Bipartite mRNA for chicken alpha-fibrinogen potentially encodes an amino acid sequence homologous to beta- and gamma-fibrinogens.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **87**(13): 5198-202.
- White, CB; Chen, Q; Kenyon, GL und Babbitt, PC (1995) *A novel activity of OmpT. Proteolysis under extreme denaturing conditions.* J. Biol. Chem. **270**(22): 12990-4.
- Wiman, B (1980) *On the reaction of plasmin or plasmin-streptokinase complex with aprotinin or alpha 2-antiplasmin.* Thromb. Res. **17**(1-2): 143-52.

- Wolfsberg, TG; Primakoff, P; Myles, DG und White, JM (1995) *ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions*. J. Cell Biol. **131**(2): 275-8.
- Yamamoto, M; Nakagaki, T und Kisiel, W (1992) *Tissue factor-dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII*. J. Biol. Chem. **267**(27): 19089-94.
- Yang, Z; Kollman, JM; Pandi, L und Doolittle, RF (2001) *Crystal structure of native chicken fibrinogen at 2.7 Å resolution*. Biochemistry **40**(42): 12515-23.
- Young, KC; Shi, GY; Wu, DH; Chang, LC; Chang, BI; Ou, CP und Wu, HL (1998) *Plasminogen activation by streptokinase via a unique mechanism*. J. Biol. Chem. **273**(5): 3110-6.
- Zhang, Z; Winyard, PG; Chidwick, K; Murphy, G; Wardell, M; Carrell, RW und Blake, DR (1994) *Proteolysis of human native and oxidised alpha 1-proteinase inhibitor by matrilysin and stromelysin*. Biochim. Biophys. Acta **1199**(2): 224-8.
- Zhou, Q; Zhao, J; Stout, JG; Luhm, RA; Wiedmer, T und Sims, PJ (1997) *Molecular cloning of human plasma membrane phospholipid scramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids*. J. Biol. Chem. **272**(29): 18240-4.
- Zucker, S; Conner, C; DiMassmo, BI; Ende, H; Drews, M; Seiki, M und Bahou, WF (1995) *Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells. Physiologic regulation of angiogenesis*. J. Biol. Chem. **270**(40): 23730-8.

Anhang Kristallographische Begriffe

Auflösung	Abstand d_{\min} der Gitterebenen in einem gegebenen Kristall gemäß der Bragg'schen Gleichung: $d_{\min} = \frac{l}{2 \sin \theta_{\max}}$, wobei θ_{\max} den Beugungswinkel darstellt, bei dem das Diffraktionsbild verschwindet
Datensatz	Ergebnis der Auswertung einer Serie von Diffraktionsbildern, welches die gemessenen Reflexe in Form von numerischen Werten der Strukturfaktoramplituden ($ F_{hkl} $) darstellt
Derivat-Datensatz	Datensatz von einem Proteinkristall, der durch die Reaktion mit einer Schwermetallverbindung eine lokale Änderung der Elektronendichteverteilung aufweist
Nativer Datensatz	Datensatz von einem unveränderten Proteinkristall, d.h. nicht mit einer Schwermetallverbindung behandelt
Differenz-Fourier	Fouriersumme, bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden: die resultierende Elektronendichtekarte gibt die molekularen Unterschiede wieder, welche die Differenzen in den Strukturfaktoramplituden erzeugen.
Differenz-Patterson	Pattersonfunktion bei der Differenzen zwischen Strukturfaktoramplituden als Koeffizienten benutzt werden
F_{calc}	Strukturfaktoren, die aus den Koordinaten eines Modells berechnet wurden, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{\text{calc}} $ (kürzer F_c) und den Phasenwinkeln α_{calc} zusammensetzen.
F_{obs}	experimentelle Strukturfaktoren, die sich aus den Strukturfaktoramplituden $ F_{\text{obs}} $ (kürzer F_o) und falls experimentell bestimmt, den Phasenwinkeln α_{obs} zusammensetzen.
Multiplizität	Mittelwert des Verhältnisses aus Anzahl der gemessenen Reflexe und der kristallographisch unabhängigen Reflexe
R-Faktoren	werden in der Kristallographie dazu verwendet, um die Übereinstimmung von zwei Messwerten oder der Messwerte mit dem Modell zu beschreiben
R, R_{cryst}	Beschreibung der Qualität einer verfeinerten Kristallstruktur als Funktion

	<p>der Übereinstimmung von F_{calc} und F_{obs}; $R = \frac{\sum_{hkl} \left F_{obs} - k F_{calc} \right }{\sum_{hkl} F_{obs} }$, wo-</p> <p>bei k einen Skalierfaktor darstellt, um die gemessenen und die berechneten Strukturfaktoramplituden auf eine einheitlich Skala zu bringen</p>
R_{free}	<p>wird analog zu R mit einem bestimmten Anteil der Reflexe (<i>test set</i>) berechnet, die nicht bei der Verfeinerung berücksichtigt wurden, dies soll eine Überanpassung des Modells verhindern; $R_{free} = \frac{\sum_{hkl \subset T} \left F_{obs} - k F_{calc} \right }{\sum_{hkl \subset T} F_{obs} }$, wobei</p> <p>$hkl \subset T$ alle Reflexe des <i>test set</i> bezeichnet</p>
R_{sym}	<p>Beschreibung der Qualität eines Datensatzes als Funktion der Übereinstimmung von symmetrieverwandten Reflexen;</p> $R_{sym}(I) = \frac{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl) - \overline{I(hkl)} }{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$ <p>für n unabhängige Reflexe und i Beobachtungen eines gegebenen Reflexes</p>
<i>rigid body</i>	Bezeichnung für die Verfeinerung von ganzen Molekülen (oder Molekülteilen) als starre Körper
r.m.s bzw. RMS	Quadratisches Mittel („ <i>root mean square</i> “), das in der Regel zur Angabe von Abweichungen verwendet wird, im Gegensatz zum Geometrischen Mittelwert werden hohe Differenzen stärker gewichtet
<i>simulated annealing</i>	Verfeinerungsalgorithmus in CNS, bei dem im Rahmen einer Moleküldynamikrechnung die Temperatur des Systems virtuell erhöht wird, um so den Konvergenzradius der Verfeinerung zu verbessern
Solvensbereich	zusammenhängender Bereich in Proteinkristallen, der mit Lösungsmittel gefüllt ist
Solvensgehalt	Anteil des Solvensbereich am Gesamtvolumen
<i>test set</i>	Teil der Strukturfaktoren eines Datensatzes, der nur zur Berechnung von R_{free} benutzt und nicht zur Verfeinerung herangezogen wird (in der Regel ca. 5-10% der gemessenen Strukturfaktoramplituden)
Vollständigkeit (<i>completeness</i>)	prozentualer Anteil der gemessenen unabhängigen Reflexe im Vergleich zur Anzahl der theoretisch möglichen Strukturfaktoren

<i>working set</i>	Strukturfaktoren, die nicht zum <i>test set</i> gehören und zur Verfeinerung benutzt werden (90-95% der gemessenen Strukturfaktoramplituden)
Unabhängige Reflexe	Anzahl der unabhängigen Reflexe bzw. Strukturfaktoramplituden, die nicht über eine kristallographische Symmetrie verwandt sind

Kristallographische Daten**Thrombin-I-11**

Kristall	α -Thrombin-I11 (18-1,8 Å)
Kristallbedingung	100 mM Kaliumphosphat pH 5,6 20% (w/v) PEG 6000
Raumgruppe	C2
Moleküle in der asymmetrischen Einheit	1
a (Å)	69,84
b (Å)	71,51
c (Å)	71,71
β (°)	99,34
R _{sym} (%)	5,7
R _{sym} (äußerste Schale, %)	29,8
Unabhängige Reflexe	30 387
Vollständigkeit (%)	94,4
Vollständigkeit (äußerste Schale, %)	92,6
Größe des <i>test set</i> (%)	4
Finaler R (%)	19,1
Finaler R _{free} (%)	22,0
<i>rmsd</i> Bindungen (Å)	0,012
<i>rmsd</i> Winkel (°)	1,7

Staphylocoagulase

Kristall	mSTC ⁰⁻³²⁷ -Thrombin-PPACK (20-2.2 Å)			STC ¹⁻³²⁷ -Präthrombin-2-PPACK (25-2.1 Å)		
Kristallbedingung	100 mM Imidazol pH 7,5 200 mM Natriumformiat 12% (w/v) PEG 4000					
Raumgruppe	C2					
Moleküle in der asymmetrischen Einheit	2					
a (Å)	180,17			181,16		
b (Å)	102,00			102,34		
c (Å)	135,30			135,54		
β (°)	130,08			129,91		
Wellenlänge (Å)	1,0085	1,0050	0,9200	1,0092	1,0000	0,9500
R _{sym}	0,048	0,044	0,042	0,048	0,039	0,042

Anhang

R_{sym} (äußerste Schale, %)	0,269	0,232	0,236	0,269	0,260	0,243
Unabhängige Reflexe	95 100	95 248	95 061	110 873	110 836	110 669
Vollständigkeit (%)	97,5	97,4	91,1	90,4	91,1	94,3
Vollständigkeit (äußerste Schale, %)	96,4	96,5	35,4	74,7	83,4	90,6
Größe des <i>test set</i> (%)		4,8			4,6	
Finaler R_{free} (%)		25,0			26,5	
Finaler R (%)		21,1			22,3	
<i>rmsd</i> Bindungen (Å)		0,012			0,011	
<i>rmsd</i> Winkel (°)		1,56			1,55	

MT-SP1

Kristall	MT-SP1-Benzamidin (20-1,3 Å)	MT-SP1-BPTI (12-2,93 Å)
Kristallbedingung	100 mM Tris-HCl pH 8.0 1,5 M Ammoniumsulfat 3% (v/v) Ethanol	100 mM Hepes pH 6,5 20% (w/v) PEG 4000 2% (w/v) CsCl ₂
Raumgruppe	C222	P1
Moleküle in der asymmetrischen Einheit	1	2
a (Å)	66,92	47,10
b (Å)	141,60	54,23
c (Å)	51,94	67,82
α (°)	90	107,62
β (°)	90	96,86
γ (°)	90	103,36
R_{sym} (%)	8,6	12,0
R_{sym} (äußerste Schale, %)	29,4	34,3
Unabhängige Reflexe	58 805	12 200
Vollständigkeit (%)	96,2	94,4
Vollständigkeit (äußerste Schale, %)	93,5	93,1
Größe des <i>test set</i> (%)	5,1	8,1
Finaler R_{free} (%)	19,3	27,9
Finaler R (%)	18,4	19,9
<i>rmsd</i> Bindungen (Å)	0,010	0,007
<i>rmsd</i> Winkel (°)	1,6	1,4

Abkürzungen

↓	zu spaltende Peptidbindung	min	Minute
% (v/v)	Volumenprozent	MMP	Matrix-Metalloproteinase
% (w/v)	Gewichtsprozent	MT	Membran-Typ
Å	Ångström (1 Å=10 ⁻¹⁰ m)	MW	Molekulargewicht
ADAM	<i>a disintegrin and metalloproteinase domain</i>	OD	Optische Dichte
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	p. A.	zur Analyse
BPTI	basischer pankreatischer Trypsin-Inhibitor	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
°C	Grad Celsius	PEG	Polyethylenglykol
Da	Dalton	Plg	Plasminogen
DESY	Deutsches Elektronensynchrotron	PPACK	D-Phenylalanin-Prolin-Arginin-Chloromethylketon
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure	rms	<i>root mean square</i>
EC	<i>Enzyme commission</i>	RT	Raumtemperatur
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	SAK	Staphylokinase
EZM	extrazelluläre Matrix	SDS	Natriumdodecylsulfat
F	Blutgerinnungsfaktor	SK	Streptokinase
Fgn	Fibrinogen	SP	Serinproteinase
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	STC	Staphylocoagulase
g	Erdbeschleunigung	TCA	Trichloressigsäure
h	Stunde	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure	tPA	<i>tissue</i> -Typ-Plasminogen-Aktivator
IPTG	Isopropyl-D-Thiogalaktopyranosid	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
k	Kilo- (10 ³)	TTSP	Typ-II-Transmembran-Serinproteinase
K	Kelvin	uPA	Plasminogen-Aktivator vom Urokinase-Typ
μ	Mikro- (10 ⁻⁶)	Upm	Umdrehungen pro Minute
LB	Luria-Bertani	ü.N.	über Nacht
m	Milli- (10 ⁻³)	UV	ultraviolett
M	Molar (mol/l)	V	Volt
MAD	Multiple Anomale Dispersion	VIS	sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts

Verwendete Nomenklatur der Aminosäuren

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode (im Text verwendet)
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
N _α -Methyl-Arginin	N _α (Me)Arg	R ^M
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure (Aspartat)	Asp	D
Cystein	Cys	C
Cyclohexylalanin	Cha	Z
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure (Glutamat)	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V
beliebige Aminosäure	Xaa	X

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Januar 1999 bis Oktober 2002 in der Abteilung für Strukturforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried unter der Leitung von Prof. Dr. Robert Huber und Prof. Dr. Wolfram Bode durchgeführt.

Prof. Dr. *Robert Huber* und Prof. Dr. *Wolfram Bode* möchte ich für die Überlassung der interessanten Themen, ihre stete Diskussionsbereitschaft und großzügige Förderung bei dieser Arbeit danken. Vor allem die große Freiheit bei der Arbeit und ihre wertvollen Anregungen haben zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Genosse und Doktor *Pablo Fuentes-Prior* verlor trotz meiner langen Leitung nie den Glauben daran, daß ich irgendwann die Baseballregeln verstehen würde. Daß es dazu nie kam, liegt an seinem stetigen Vorwärtstreiben unserer Projekte. Deren Gelingen ist vor allem der Verdienst meines einzigen Vereinskameraden in der ganzen Abteilung. Sein Trost und seine Aufmunterung nach Derby- sowie Laborniederlagen trugen zu einer positiveren Weltsicht bei — *never give up - never surrender*. Vielen Dank für die nie ermüdende Hilfsbereitschaft, ich werde mir ein Beispiel daran nehmen.

Herr Dr. *Michael Groll* stellte sich freundlicherweise als ständige Geldquelle beim Schafkopfen und Essenspartner zur Verfügung und sorgte damit für mein finanzielles Überleben und ein neues Gewicht. Vielen Dank für die rege Unterstützung bei der Pflege meiner Muttersprache, sie funktionierte auch nach mehreren Cocktails. Meinen Lieblingsschwob Dr. *Tobias Ullrich* konnte ich dagegen immer erst nach mehrmaligem Nachfragen verstehen. Ohne seine Freundschaft hätte ich bestimmt schon ganz früh alles hingeschmissen. Dafür gibt's noch ein Schnitzel (aber nur eins!!). Dr. *Michael Blaesse* wird mich niemals zu Linuxsch bekehren können, hat mir aber trotz meiner Sturheit immer wieder geduldig bei Problemen mit selbigem und Junixsch geholfen. Dr. *John Lee Richardson* ertrug meine langen Jammerarien und meine Pipettenentwendungen mit britischer Gelassenheit und war immer für ein Augustiner gut, dann war's meistens auch mit Jammern vorbei. Ich habe die Pipetten jetzt übrigens zurückgelegt. Herr *Klaus Richter* war im Labor wie im richtigen Leben mein unerschütterlicher Freund.

Michael Engel, Dr. *Norman Kairies*, *Kerstin Rohr*, *Anna Tochowicz* und *Rasso Willkomm* haben das Kinderzimmer geprägt und immer dafür gesorgt, daß es seinen Namen verdient. Der ruhmreiche *Martin Augustin* war der Grund, warum ich den Versuch, einen Löwenschal aufzuhängen, erst gar nicht unternommen habe.

Dankeschön

Gina Beckmann und *Monika Bumann* danke ich für ihre immerwährend freundliche Hilfe bei allen bürokratischen Angelegenheiten. *Renate Rüller* kümmerte sich nicht nur stets sofort um alle unmöglichen Probleme, sondern hatte auch immer Zeit für ein paar nette Worte. *Werner Dersch* und *Ottmar Paul* danke ich für die Wartung der technischen Geräte in der Arbeitsgruppe und bereitwillige Reparatur aller Dinge, die ich gerade kaputtgemacht hatte (so viele waren's auch wieder nicht).

Dr. *Gleb Bourenkow* danke ich für die geduldige Unterstützung bei vielen Aufenthalten am Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg.

Ein besonders herzliches Dankeschön gilt *meinen Eltern* für ihre Liebe, den starken Rückhalt und für die finanzielle Unterstützung während des Studiums. *Verena* danke ich für die Engelsgeduld bei allabendlicher schlechter Laune, die bei einem guten Essen aber meist schnell verflog. Ein Schnitzel wird da nicht reichen.