

Strukturbasiertes Wirkstoffdesign am Beispiel der  
Topoisomerase I aus *Thermotoga maritima* und der  
humanen neutrophilen Elastase

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln

**vorgelegt von**  
Guido Hansen  
**aus Dorsten**

Köln 2005



Berichtersteller:

Prof. Dr. Dietmar Schomburg  
Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der mündlichen Prüfung:

12. Juli 2005





Für die bloße ratio sieht die Welt  
immer zweidimensional aus.

(H. Hesse)



## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg für die interessanten und herausfordernden Projekte, das mir stets entgegengebrachte Vertrauen, die eingeräumten Freiheiten bei der strategischen Ausrichtung der Arbeit und insbesondere für die vielfältigen Möglichkeiten, Projekte in Kooperation mit anderen akademischen und industriellen Gruppen durchzuführen zu können,

Frau Prof. Dr. Sabine Waffenschmidt für die Übernahme des Coreferates,

Herrn Dr. Peter Reinemer für die Möglichkeit, ein interessantes Projekt in einem hervorragend ausgestatteten Institut der BayerHealthCare AG in Wuppertal durchführen zu können, für die Unterstützung während der praktischen Arbeit, der Publikation der Ergebnisse und die kurzfristige und großzügige Organisation von Synchrotron-Messzeit in Villingen und Grenoble,

Herrn Dr. Karsten Niefind für die Einführung in die theoretischen Hintergründe der Proteinkristallographie mit vielen praktischen Hilfen und Diskussionen, die Identifikation von ersten Kristallisationsbedingungen der humanen neutropilen Elastase, die kontinuierliche, kompetente Unterstützung und die Durchsicht der Arbeit,

Herrn Dr. Axel Harrenga für viele praktischen Tipps bei der Proteinreinigung und der Kristallisation, die interessanten Diskussionen und Hilfen bei der Strukturlösung der Topoisomerase, für so manche entspannende Espresso-Runde in einer freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre,

Herrn Dr. Bernd Wieland und Frau Dr. Laila Narouz-Ott für die hilfreichen Diskussionen und die kompetente Unterstützung bei der Klonierung und Proteinreinigung verschiedener Topoisomerasen,

Frau Dr. Annette Faust für einige durchwachte Synchrotron-Messnächte, ausführliche Diskussionen von röntgenkristallographischen Problemen, für viele aufmunternde Kommentare und geteilte Pacific-Salate im Borsalino,

Herrn Michael Zimmermann für die schnelle und unkomplizierte Lösung von computertechnischen Problemen,

dem gesamten RPG-Team und der Badminton-Runde, die halfen, nicht zu vergessen, dass es auch andere wichtige Dinge neben der Aufklärung von Proteinstrukturen gibt,

und nicht zuletzt bei meiner Freundin Kathrin, die mich auch in schwierigen Situationen immer unterstützte und ohne deren Fürsorge um mein leibliches und seelisches Wohl, diese Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre.

Vielen Dank !

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	VII

## 1 Einleitung..... 1

1.1	Wirkstoffdesign und Röntgenstrukturanalyse.....	1
1.2	Bakterielle Topoisomerasen .....	5
1.2.1	Topoisomerasen regulieren die Topologie der DNA .....	5
1.2.2	Die Familie der Typ IA Topoisomerasen.....	7
1.2.3	Struktur und katalytischer Mechanismus von Typ IA Topoisomerasen... 9	
1.2.4	Topoisomerase I aus <i>Thermotoga maritima</i> .....	12
1.3	Serinproteasen .....	15
1.3.1	Katalytischer Mechanismus von Serinproteasen .....	15
1.3.2	Humane neutrophile Elastase und mit dem Enzym verbundene Krankheitsbilder.....	18
1.3.3	Inhibitoren der HNE .....	20
1.3.4	Entwurf eines neuen HNE-Inhibitors.....	24
1.4	Zielsetzung der Arbeit .....	25

## 2 Material und Methoden..... 27

2.1	Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme.....	27
2.1.1	Chemikalien.....	27
2.1.2	Materialien, Geräte und EDV-Systeme .....	27
2.2	Molekularbiologie .....	30
2.2.1	Mikroorganismen und Medien.....	30
2.2.2	Isolation von genomischer DNA aus <i>T. maritima</i> .....	31
2.2.3	Klonierung des Zielplasmids .....	31
2.2.4	Hitzeschock-Transformation .....	33
2.2.5	Plasmidpräparation .....	33

2.2.6	Restriktionsanalyse und Sequenzierung des <i>topA</i> -Plasmids .....	34
2.3	Proteinexpression und Reinigung.....	35
2.3.1	Allgemeines.....	35
2.3.2	Proteinexpression .....	36
2.3.3	Zellaufschluss .....	36
2.3.4	Proteinreinigung .....	37
2.4.	Proteinanalytik.....	39
2.4.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39
2.4.2	Proteinkonzentrationsbestimmung .....	39
2.4.3	Massenspektrometrie.....	40
2.4.4	DNA-Relaxationstest der TmTop I und der EcTop I .....	40
2.5	Proteinkristallisation .....	42
2.5.1	Kristallisation von Apo-Proteinen und Ko-Kristallisation mit Inhibitoren	42
2.5.2	Einbringen von Inhibitoren in bestehende Kristalle .....	44
2.6	Diffractionsexperimente .....	45
2.6.1	Allgemeines.....	45
2.6.2	Datensätze der TmTop I.....	45
2.6.3	Datensatz des HNE-Apo-Enzyms .....	46
2.6.4	Datensatz des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes.....	47
2.6.5	Datensatz des HNE-WO24700-Komplexes .....	47
2.7	Datenreduktion.....	48
2.8	Strukturlösung durch Molekularen Ersatz .....	49
2.8.1	Strukturlösung der TmTop I.....	49
2.8.2	Strukturlösung des HNE-Apo-Enzyms und der HNE-Inhibitorkomplexe	49
2.9	Modellbau und Verfeinerung.....	50
2.10	Validierung und Darstellung der Modelle .....	52
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>53</b>
3.1	Topoisomerase I aus <i>T. maritima</i> .....	53
3.1.1	Klonierung des <i>topA</i> -Gens.....	53
3.1.2	Reinigung der TmTop I .....	55
3.1.3	Proteinanalytik.....	58
3.1.4	Kristallisation der TmTop I.....	61
3.1.5	Diffractionsmessungen .....	63

3.1.6	Analyse des Inhaltes der asymmetrischen Einheit.....	66
3.1.7	Strukturlösung und Verfeinerung .....	68
3.1.8	Qualität der TmTop I-Strukturen .....	73
3.1.9	Übersicht über die Struktur der TmTop I .....	76
3.1.10	Struktur des Zink-Bindemotivs in Domäne V.....	86
3.1.11	Erweiterte DNA-Bindespalte in TmTop I .....	90
3.1.12	Struktur der C-terminalen Domäne anderer Topoisomerasen.....	95
3.2	Humane neutrophile Elastase.....	99
3.2.1	Proteinanalytik .....	99
3.2.2	Kristallisation der HNE .....	101
3.2.3	Diffractionsmessungen der HNE-Kristalle .....	103
3.2.4	Analyse des Inhaltes der asymmetrischen Einheit.....	105
3.2.5	Strukturlösung und Verfeinerung .....	106
3.2.6	Qualität der HNE-Strukturen .....	113
3.2.7	Übersicht über die Struktur der HNE .....	116
3.2.8	Struktur des HNE-Komplexes mit TFA-Val-Tyr-Val-OH.....	120
3.2.9	Struktur des HNE-Komplexes mit WO24700.....	125
3.2.10	Struktureller Vergleich des HNE-Apo-Enzyms mit HNE- Inhibitorkomplexen .....	129
3.2.11	Struktureller Vergleich der HNE-Inhibitorkomplexe mit anderen publizierten HNE-Strukturen .....	134
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>139</b>
	<b>Anhang .....</b>	<b>143</b>
A1	Kurzzusammenfassung.....	143
A2	Abstract .....	144
A3	Vorabveröffentlichungen .....	145
A4	Literaturverzeichnis .....	146
A5	Abbildungsverzeichnis .....	154
A6	Tabellenverzeichnis .....	156
A7	Lebenslauf .....	158
A8	Erklärung .....	159





# Abkürzungsverzeichnis

## Aminosäuren

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

## Sonstige Abkürzungen

a, b, c	Gittervektoren im realen Raum
$\alpha, \beta, \gamma$	Winkel zwischen den Gitterachsen
AU	asymmetrische Einheit der Elementarzelle eines Kristalls
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i> )
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
EcTop	Topoisomerase aus <i>Escherichia coli</i>
EC	<i>enzyme catalogue</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat-di-Natriumsalz
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
$F_c$	berechnete Strukturfaktoramplituden
$F_o$	gemessene Strukturfaktoramplituden
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HNE	humane neutrophile Elastase
I	Intensität
$\sigma(I)$	Standardabweichung der Intensität
IPTG	$\beta$ -D-Thio-galakto-pyranosid
$\lambda$	Wellenlänge
LB	<i>Luria broth</i> (Nährmedium)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations Massenspektroskopie (engl. <i>matrix assisted laser desorption and ionization</i> )
NCS	nicht-kristallographische Symmetrie (engl. <i>non crystallographic symmetry</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
$R_{\text{free}}$	freier R-Wert
$R_{\text{work}}$	R-Wert des Arbeitsdatensatzes

R <sub>merge</sub>	linearer R-Wert beim Zusammenfassen von Röntgendatensätzen
RMSD	mittlere quadratische Abweichung (engl. <i>root mean square deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
TmTop	Topoisomerase aus <i>Thermotoga maritima</i>
TOF	Flugzeit (engl. <i>time of flight</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolettes Licht
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen



# 1 Einleitung

## 1.1 Wirkstoffdesign und Röntgenstrukturanalyse

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign geht von der grundsätzlichen Annahme aus, dass ein Arzneimittel an ein definiertes molekulares Zielmolekül (*target*) binden muss, um seine Wirkung zu entfalten. In vielen Fällen ist dieses Zielmolekül ein Protein. Voraussetzung für eine starke und selektive Bindung ist eine möglichst weitgehende strukturelle und chemische Komplementarität zwischen dem Zielprotein und dem Wirkstoff. Strukturbasiertes Wirkstoffdesign ist die Suche nach einem kleinen Molekül, das möglichst perfekt in die Bindetasche des Zielproteins hineinpasst und dort in der Lage ist, energetisch günstige Wechselwirkungen mit dem Protein auszubilden.

Die Zahl der bekannten 3D-Strukturen von Proteinen hat in den vergangenen Jahren exponentiell zugenommen. Das rasante Anwachsen von verfügbaren Proteinstrukturen ist signifikanten Fortschritten in der Gentechnologie, der Proteinchemie und der Strukturaufklärung zu verdanken. So sind heute die 3D-Strukturen einer Vielzahl von therapeutisch relevanten Proteinen aufgeklärt. Entsprechend wurden Methoden zur Nutzung dieser Informationen für den Entwurf neuer Wirkstoffe entwickelt. Das große Interesse an der Strukturbiologie und eine Reihe wichtiger technologischer Fortschritte ermöglichten in den letzten Jahren eine zunehmende Industrialisierung des Prozesses der Aufklärung von Proteinstrukturen (Klebe, 2000).

Die beiden wichtigsten experimentellen Methoden zur Strukturbestimmung von Proteinen sind die Röntgenkristallographie und die hochauflösende NMR-Spektroskopie. In jüngerer Zeit gewinnt die Elektronenmikroskopie vor allem bei der Strukturbestimmung membrangebundener Proteine an Bedeutung. Die Röntgenkristallographie ist eine leistungsfähige Methode zur Bestimmung der exakten Raumposition fast aller Atome eines Proteinmoleküls. Um die Struktur eines Zielproteins mittels Röntgenkristallographie bestimmen zu können, muss zunächst eine ausreichend große Menge des gereinigten Proteins verfügbar sein. Nun folgt der oftmals langwierige und mit Schwierigkeiten verbundene Prozess der Kristallisation. Konnten Proteinkristalle hergestellt werden, die Röntgenstrahlen in ausreichendem Maße beugen, ist es mit den zur Verfügung stehenden modernen Methoden in der

## 1 Einleitung

---

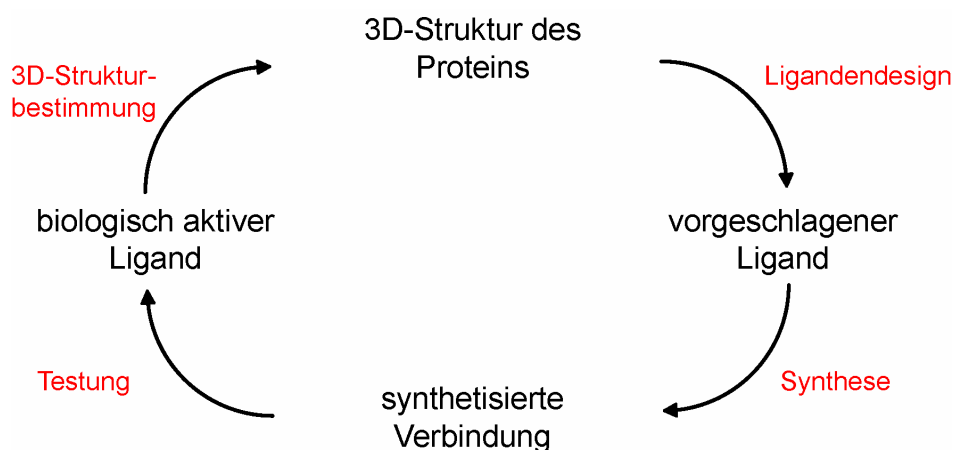
Regel möglich, die Struktur des Proteinmoleküls im Kristallverband aufzuklären. Obwohl die Röntgenkristallographie hohe Anforderungen an die Qualität der Proteinprobe stellt und die Kristallisation des Proteins oft mit erheblichem Aufwand verbunden ist, bietet die Methode entscheidende Vorteile. Zum einen ist der Prozess der röntgenkristallographischen Strukturaufklärung nicht durch die Größe des Zielmoleküls limitiert, so konnten in den letzten Jahren auch sehr große Proteinkomplexe mit einer Masse von mehreren tausend Kilodalton aufgeklärt werden. Zum anderen haben neuere Entwicklungen zur Automatisierung von Klonierung, Reinigung und Kristallisation von Zielproteinen und die Verfügbarkeit leistungsfähiger Computer mit entsprechender Software den Prozess der Strukturaufklärung erheblich erleichtert. In den letzten Jahren sind deshalb mehrere Projekte ins Leben gerufen worden, die sich zum Ziel gesetzt haben, die Struktur aller Proteine eines bestimmten Organismus aufzuklären. Beispiele sind das Berkeley Structural Genomics Center (BSGC), das Joint Center for Structural Genomics (JCSG) und das Center for Eukaryotic Structural Genomics (CESG). Obwohl die Komplexität des Strukturaufklärungsprozesses die Automatisierung stark erschwert, ist auf diesem Gebiet eine ähnliche Entwicklung möglich, wie sie im letzten Jahrzehnt im Bezug auf die Genom-Sequenzierung zu beobachten war.

Für die Pharmaforschung ist Röntgenkristallographie besonders interessant, da die Methode nach der Kristallisation des freien Zielproteins das Einlegen dieser Kristalle in eine Lösung des Wirkstoffs (*soaking*) erlaubt. Der hohe Wassergehalt von Proteinkristallen ermöglicht es, dass Wirkstoffmoleküle über Lösungsmittelkanäle in den Kristall eindringen, bis zu einer Bindetasche diffundieren und sich dort anlagern. Im Idealfall können so auf vergleichbar einfache Weise Komplexstrukturen vieler unterschiedlicher Wirkstoffmoleküle mit dem Zielprotein untersucht werden.

Die Entwicklung eines Wirkstoffes wird im allgemeinen in vier Phasen gegliedert: Identifizierung des Zielmoleküls, Suche nach einer Leitstruktur, Optimierung der Leitstruktur und Durchführung klinischer Studien. Werden alle Phasen erfolgreich durchlaufen, kann eine Zulassung des neuen Wirkstoffs als Arzneimittel beantragt werden. Strukturbasierte Methoden können diesen Prozess zu verschiedenen Zeitpunkten unterstützen. So lassen sich aus der Analyse der 3D-Struktur des Zielproteins oftmals Aussagen über die grundlegenden chemischen Eigenschaften der Bindetasche und eines potentiellen Liganden ableiten. Unter anderem können Aussagen über den Ort der Bindung des Liganden, z.B. das aktive Zentrum eines Enzyms gemacht werden. Auch die Vorhersage chemischer Gruppen, die besonders geeignet sind, um in der Bindetasche günstige Wechselwirkungen auszubilden, kann

bei der Identifikation von Leitstrukturen helfen. Falls zum Zeitpunkt der Strukturaufklärung bereits Bindungsaffinitäten mehrerer Liganden bekannt sind, kann die Struktur des freien Proteins verwendet werden, um Struktur-Wirkungsbeziehungen zu erklären. Mit Hilfe computergestützter Methoden lassen sich Liganden in die Bindetasche des Proteins einpassen (*docking*) und beispielsweise Bereiche der Tasche identifizieren, die von bekannten Liganden noch nicht belegt werden. Mit geeigneten modifizierten Verbindungen können dann zusätzliche Wechselwirkungen genutzt werden, um eine stärkere und selektivere Bindung zu erzielen (Klebe et al., 2000).

Auch nach der strukturellen Charakterisierung des Zielproteins und der Bestimmung möglicher Protein-Ligand-Wechselwirkungen können 3D-Strukturen die Entwicklung von Wirkstoffen erheblich beschleunigen. Meist wird hierzu eine iterative Vorgehensweise notwendig (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1:** Typische Vorgehensweise beim strukturbasierten Wirkstoffdesign.

Die 3D-Struktur eines Proteins oder eines Protein-Wirkstoff-Komplexes ist der Ausgangspunkt für den Entwurf einer neuen Verbindung oder die Modifikation eines bekannten Liganden. Informationen aus der Röntgenstruktur ermöglichen das Design eines modifizierten Liganden mit besseren Bindungseigenschaften. Im folgenden wird dieser Ligand synthetisiert und meist biochemisch auf Bindung zum Zielprotein getestet. Im Fall einer guten Bindung wird nun versucht, die 3D-Struktur des Protein-Ligand-Komplexes zu bestimmen. Diese neue Struktur ist nun Ausgangspunkt des nächsten Design-Zyklus. Der große Vorteil des Verfahrens ist, dass bei jedem Zyklus

## 1 Einleitung

---

die getroffenen Annahmen bezüglich der Interaktionen innerhalb der Protein-Bindetasche überprüft werden können. So werden unterschiedliche Bindungsmodi strukturell ähnlicher Liganden offensichtlich, die mitunter die Struktur-Wirkungsbeziehungen verschleiern können. Deshalb kann es im Verlauf des Prozesses wichtig sein, auch schlecht bindende Liganden strukturell zu charakterisieren, um dieses Verhalten erklären zu können. Die Erkenntnisse können dann in Vorschlägen für neue Strukturen umgesetzt werden.

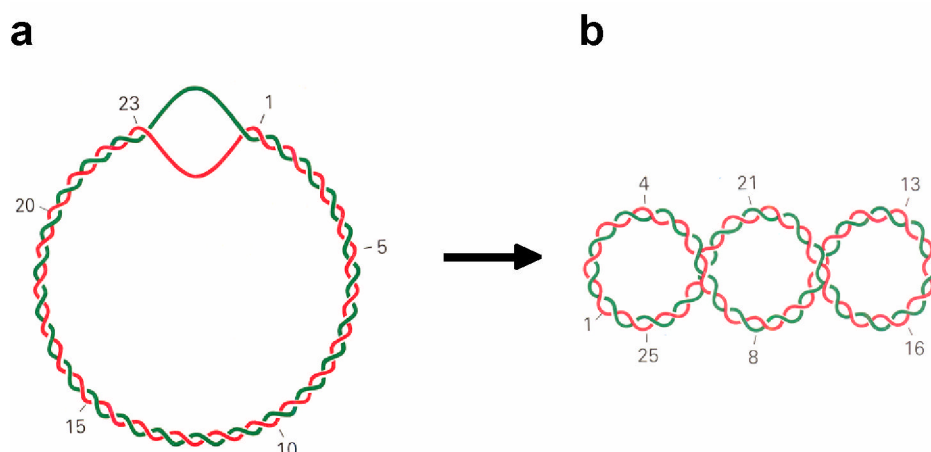
Mehrere Arzneimittel, die auf einen strukturbasierten Ansatz zurückgehen, sind ein eindeutiger Beleg für das Potential der Methode. Als Beispiel sind Inhibitoren der HIV-Protease, der Thymidylatsynthetase und der  $\beta$ -Lactamase zu nennen, die durch *de novo*-Design oder strukturbasierte Optimierung bestehender Verbindungen entwickelt wurden. Die innovativen und unterstützenden Methoden des strukturbasierten Wirkstoffdesigns sind aus der modernen Pharmaforschung deshalb nicht mehr wegzudenken.



## 1.2 Bakterielle Topoisomerasen

### 1.2.1 Topoisomerasen regulieren die Topologie der DNA

Die genetische Information von Bakterien liegt in Form zirkulärer DNA-Moleküle vor. Eine wichtige topologische Eigenschaft eines zirkulären DNA-Moleküls ist seine Verwindungszahl (engl. *linking number*). Sie ist definiert durch die Anzahl der Rechtswindungen eines DNA-Stranges um die in eine Ebene gespannte Helixachse. Zirkuläre DNA-Moleküle können unterschiedliche Konformationen annehmen, die nur durch das Schneiden eines oder beider Stränge der Doppelhelix ineinander überführt werden können. Zwei Moleküle mit unterschiedlichen Konformationen dieser Art werden als Topoisomere bezeichnet. Abbildung 1.2 zeigt wie nach Einführung eines Einzelstrangbruches durch eine partielle Entwindung der beiden Stränge einer DNA-Doppelhelix eine rechtsgängige oder negative Superhelixstruktur entsteht. Analog entsteht durch das Einführen zusätzlicher Windungen eine linksgängige oder positive Superhelixstruktur. Superspiralisierung verändert die Gesamtstruktur der DNA. Ein superspiralisiertes DNA-Molekül ist deutlich kompakter als ein entspanntes Molekül gleicher Länge (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2:** Ausbildung einer rechtsgängigen DNA-Superhelix. **(a)** Partiiell entwundenes zirkuläres DNA-Molekül entstanden durch die Einführung eines Einzelstrangbruches, die Entwindung von zwei helikalen Windungen und den Wiederverschluss des Bruches. **(b)** Rechtsgängige oder negative Superhelix. Beide Moleküle (a und b) weisen die gleiche Verwindungszahl auf. Abbildung modifiziert nach Saenger (1984).

## 1 Einleitung

---

Das Ausmaß der Superspiralisierung eines DNA-Moleküls wird durch die Superhelixdichte ausgedrückt, die unabhängig von der Anzahl der Basenpaare des Moleküls ist. Die meisten natürlich vorkommenden DNA-Moleküle besitzen eine Superhelixdichte von  $-0.06$ , sie sind somit also partiell entwunden und weisen negative Superhelices auf. Die negative Superspiralisierung bereitet die DNA auf Prozesse vor, die eine Trennung der beiden komplementären Stränge erfordern. Dazu gehören Replikation, Transkription und Rekombination. Eine positive Superspiralisierung komprimiert die DNA genauso effektiv wie eine negative, sie erschwert jedoch die Trennung der DNA-Stränge. Auch in eukaryotischen Genomen liegt die genetische Information in der Regel in einer kompakten Form vor, die durch Superspiralisierung gekennzeichnet ist. Hier ist die negativ-spiralisierte Superhelix zusätzlich mit Histonen assoziiert und bildet Komplexe höherer Ordnung (Saenger, 1984).

DNA-Topoisomerasen sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die die Topologie der DNA-Moleküle innerhalb der Zelle kontrollieren (Champoux, 2001; Wang, 1996). Um die Topologie von DNA-Molekülen zu verändern, spalten Topoisomerasen DNA-Einzel- oder Doppelstränge und führen einen zweiten, intakten DNA-Einzel- oder Doppelstrang durch die entstandene Öffnung. Dabei kann der intakte DNA-Einzel- oder Doppelstrang demselben DNA-Molekül oder einem anderen angehören. Im letzten Schritt der Reaktion wird die entstandene DNA-Bruchstelle vom Enzym wieder geschlossen. Topoisomerasen sind essentiell für zelluläre Prozesse wie Replikation, Transkription und Rekombination. Beispielsweise entstehen durch die Bewegung der RNA-Polymerase während der Transkription ständig superhelikale Spannungen im DNA-Molekül, die durch Topoisomerasen aufgelöst werden müssen. Die Transkription ausgehend von bestimmten bakteriellen Promotoren setzt beispielsweise ein gewisses Maß an Superspiralisierung der DNA voraus und ist somit für das Überleben der Zelle unabdingbar. Eine übermäßige negative oder positive Superspiralisierung führt im Gegensatz dazu oft zum Tod der Zelle. In der sich teilenden Zelle sorgen spezialisierte Topoisomerasen für die Trennung vollständig replizierter Chromosomen (Dekatenierung) und ermöglichen so die Verteilung der genetischen Information auf die Tochterzellen. Neben der Änderung der Verwindungszahl von zirkulären DNA-Molekülen und Dekatenierungsreaktionen ist die Strang-Passage-Aktivität von Topoisomerasen wichtig für die Entflechtung von verwundenen linearen Chromosomen bei Eukaryoten. Alle genannten Prozesse erfordern eine genaue Regulation der DNA-Topologie, um die Funktion der Zelle zu gewährleisten (Champoux, 2001; Wang, 1996). Deshalb werden die unterschiedlichen Anforderungen der Prozesse durch verschiedene, speziell auf die jeweiligen Aufgaben angepasste Topoisomerasen erfüllt.

Topoisomerasen können generell in zwei Klassen eingeordnet werden. Während Typ II Topoisomerasen beide DNA-Stränge gleichzeitig spalten, führen Typ I Topoisomerasen im Verlauf der katalytischen Reaktion Einzelstrangbrüche in die DNA ein. Topoisomerasen vom Typ I und Typ II sind nicht homolog und unterscheiden sich bezüglich ihrer Aminosäuresequenz und Struktur. Basierend auf den biochemischen Eigenschaften der Enzyme, können Typ I Topoisomerasen weiter in zwei Unterfamilien gruppiert werden: Enzyme des Typs IA bilden während der Reaktion vorübergehend eine kovalente Bindung zum 5'-Ende des gespaltenen DNA-Stranges aus, während Typ IB Topoisomerasen vorübergehend eine kovalente Bindung zum 3'-Ende formen (Champoux, 2001; Wang, 1996).

Das große Interesse, dass Topoisomerasen entgegengebracht wird, beruht nicht allein auf der entscheidenden Rolle dieser Enzyme bei der Regulation der DNA-Topologie, sondern auch auf der Entwicklung von medizinischen Wirkstoffen, die Topoisomerasen zum Ziel haben (Maxwell, 1997; Maxwell, 1999; Pommier, 1998; Rothenberg, 1997; Wang et al., 1997). Neben dem Wirkstoff Ciprofloxazin werden verwandte Chinolone als Inhibitoren der bakteriellen Topoisomerase II zur Behandlung von Infektionskrankheiten eingesetzt. Topoisomerase-Hemmer lassen sich im wesentlichen sehr gut als Antibiotika einsetzen, da sich prokaryotische und eukaryotische Topoisomerasen strukturell unterscheiden und so körpereigene Enzyme nicht oder nur geringfügig beeinflusst werden. Neben der Topoisomerase II ist auch die bakterielle Topoisomerase I ein geeignetes Zielprotein für die Entwicklung von Antibiotika.

### 1.2.2 Die Familie der Typ IA Topoisomerasen

In ihrer aktiven Form liegen Typ I Topoisomerasen in der Regel als Monomere vor. Die Familie der Typ IA Topoisomerasen zeichnet sich durch eine Reihe gemeinsamer biochemischer Eigenschaften aus (Champoux, 2001). Nach Spaltung eines DNA-Einzelstranges wird eine kovalente Phosphodiesterbindung zwischen einem Tyrosin im aktiven Zentrum des Enzyms und den 5'-Ende des gespaltenen DNA-Stranges gebildet. Natürliche Substrate von Typ IA Topoisomerasen weisen eine negative Superspiralisierung auf und werden durch die Reaktion nicht vollständig entspiralisiert. Dies ist auf die Notwendigkeit von Einzelstrangregionen für die katalytische Reaktion der Enzyme zurückzuführen (Kirkegaard und Wang, 1985). Im Gegensatz zur positiven Superspiralisierung begünstigt die negative Superspiralisierung die Öffnung des DNA-

## 1 Einleitung

---

Doppelstranges und die Bildung von Einzelstrangbereichen (Dekker et al., 2002; Wang, 1996). Weiterhin benötigen alle Typ IA Topoisomerasen Magnesium-Ionen für die DNA-Entspiralisierungsreaktion (Champoux, 2001). Neuere Methoden zur Analyse der superhelikalen Dichte an einzelnen DNA-Molekülen erlauben die genaue Untersuchung des Reaktionszyklus von Topoisomerasen. So konnte gezeigt werden, dass durch Typ IA Topoisomerasen bei jedem Reaktionszyklus die Verwindungszahl der DNA um genau eins verändert wird (Dekker et al., 2002).

Das prominenteste Mitglied der Typ IA Familie ist die Topoisomerase I (Protein  $\omega$ ) aus *E. coli*. Das Enzym wurde bereits 1971 beschrieben (Wang, 1971) und ist seitdem intensiv analysiert und biochemisch charakterisiert worden. Durch vergleichende Untersuchungen der *E. coli* Topoisomerase I mit anderen Topoisomerasen konnte gezeigt werden, dass sich die Mitglieder der Typ IA Familie trotz vieler Gemeinsamkeiten in zwei wichtigen Eigenschaften voneinander unterscheiden: Erstens bevorzugen die einzelnen Enzyme DNA-Substrate mit unterschiedlicher superhelikaler Dichte. Beispielsweise entspiralisieren prokaryotische Topoisomerasen I aus Bakterien stammende Plasmid-DNA mit moderater Superspiralisierung, demgegenüber benötigen prokaryotische und eukaryotische Topoisomerasen III viel stärker negativ superspiralisierte Substrate (DiGate und Marians, 1988; Hanai et al., 1996; Wilson et al., 2000). Verursacht wird dies wahrscheinlich durch einen Unterschied in der Affinität der Enzyme einzelsträngige DNA zu binden und daraufhin selbst eine weitere Öffnung der Doppelhelix herbeizuführen.

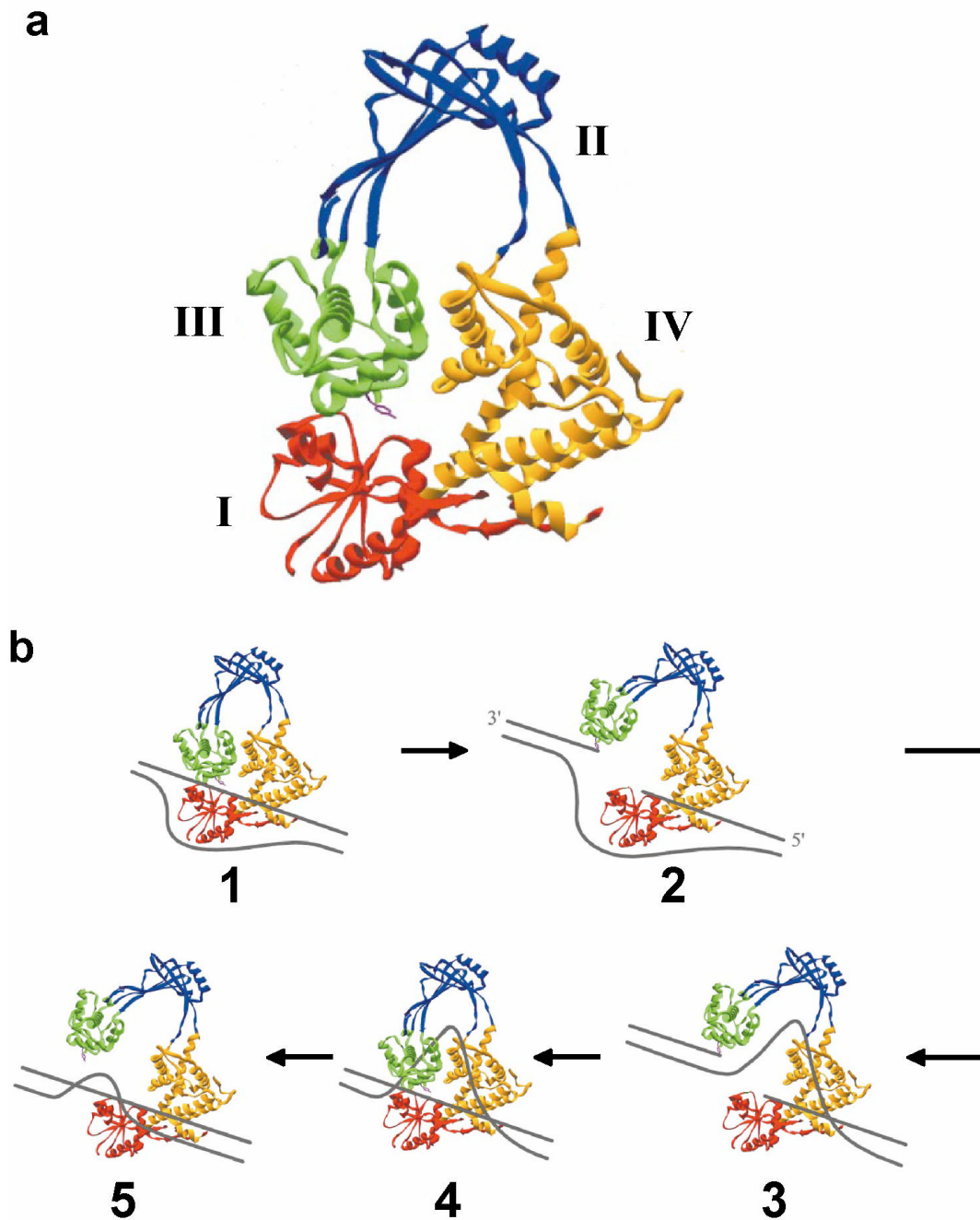
Topoisomerase I aus *E. coli* hat in der Zelle die Aufgabe, eine übermäßige negative Superspiralisierung der DNA zu verhindern. Das Einführen von negativen Superhelices ist die Hauptaufgabe einer Typ II Topoisomerase, die als DNA-Gyrase bezeichnet wird. DNA-Moleküle mit Einzelstrangregionen, die durch übermäßige Aktivität der DNA-Gyrase entstehen, werden von der Topoisomerase I als Substrat erkannt. Das Enzym ist nun so lange aktiv, bis der optimale Grad an Superspiralisierung wieder hergestellt ist und das DNA-Molekül aufgrund unzureichender Einzelstrangbereiche kein Substrat mehr darstellt. Offensichtlich wird auf diese Weise die superhelikale Dichte des Endproduktes direkt durch die Affinität der Enzyme zu Einzelstrangregionen bestimmt (Wang, 1996).

Ein zweiter wichtiger Unterschied der verschiedenen Typ IA Topoisomerasen ist die Effizienz der DNA-Entspiralisierung gegenüber Katenierungs- und Dekatenierungsreaktionen. Als DNA-Katenan wird die kettenförmige Verknüpfung mehrerer zirkulärer DNA-Molekülen bezeichnet. DNA-Katenane entstehen hauptsächlich durch die vollständige Replikation eines DNA-Rings. Während die *E. coli*

Topoisomerase III sehr effektiv Katenane nach der Replikation auflöst (DiGate und Marians, 1988; Hanai et al., 1996; Wilson et al., 2000), ist die Dekatenierungsaktivität der Topoisomerase I als eher gering einzustufen. Ein vereinfachtes Modell der Topoisomerase-Aktivitäten in *E. coli* sieht folgendermaßen aus: Die DNA-Gyrase führt negative Superhelices in die DNA ein und ist damit verantwortlich für die negative Superspiralisierung des bakteriellen Genoms. Die Topoisomerase I verhindert zusammen mit einer weiteren Topoisomerase eine übermäßige Superspiralisierung der DNA. Die Hauptaufgabe der Topoisomerase III scheint darin zu bestehen, DNA-Katenane nach der Replikation aufzulösen. An komplexen Prozessen wie Replikation und Translation sind stets mehrere Topoisomerasen gemeinsam beteiligt. Allgemein wird angenommen, dass die Funktionen und Aktivitäten der einzelnen Topoisomerasen innerhalb der Zelle so aufeinander abgestimmt sind, dass sie einander ergänzen und so gemeinsam für die Regulation der DNA-Topologie verantwortlich sind (Champoux, 2001; Wang, 1996).

### 1.2.3 Struktur und katalytischer Mechanismus von Typ IA Topoisomerasen

Die Aufklärung der Strukturen dreier Topoisomerasen der IA Familie trug entscheidend zum heutigen Verständnis der Funktionsweise dieser Enzymklasse bei. Die Strukturen des 67 kDa N-terminalen Fragmentes der *E. coli* Topoisomerase I (Lima et al., 1994), der *E. coli* Topoisomerase III (Mondragon und DiGate, 1999) und der Reversen Gyrase eines hyperthermophilen Archebakteriums (Rodriguez und Stock, 2002) zeigten, dass ein allen untersuchten Topoisomerasen gemeinsames Strukturelement für die Spaltung und DNA-Strang-Passage verantwortlich ist. Dieses Element besteht aus vier Domänen (I-IV), die so angeordnet sind, dass sie eine zentrale Öffnung umschließen (Abb. 1.3a). Während die Domänen I und IV die Basis der Struktur bilden, verbindet die langgestreckte, bogenförmige Domäne II diese Basis mit Domäne III. In allen bekannten Strukturen von Typ IA Topoisomerasen stehen Domäne I und Domäne III in engem Kontakt. Diese beiden Domänen bilden gemeinsam auch das aktive Zentrum des Enzyms. Es enthält neben dem für die Aktivität essentiellen Tyrosin weitere konservierte Aminosäuren. Das aktuelle „Enzym-Brücken-Modell“ geht von einer Dissoziation der Domänen I und III während der katalytischen Reaktion aus (Brown und Cozzarelli, 1981; Champoux, 1990; Tse und Wang, 1980). Die Strukturen der *E. coli* Topoisomerasen I und III im Komplex mit kurzen Oligonukleotiden zeigten,



**Abb. 1.3:** Modell des Reaktionsmechanismus der *E. coli* Topoisomerase I. Die einzelnen Domänen I (rot), II (blau), III (grün), IV (gelb) sind als Schleifenmodell, das katalytische Tyrosin (violett) ist als Stabmodell dargestellt. **(a)** Überblick über die Struktur der *E. coli* Topoisomerase I. **(b)** Schematische Darstellung des „Enzym-Brücken-Modells“ für den Reaktionsmechanismus der *E. coli* Topoisomerase I. DNA-Stränge sind als graue Linien dargestellt. Das Modell sieht eine Konformationsänderung des Enzyms zwischen einem geschlossenen (1, 4) und einem offenen Zustand (2, 3, 5) vor. Abbildung modifiziert nach Champoux (2001).

dass das Substrat in einer Spalte an der Basis der Enzyme bindet, die von Aminosäureresten der Domänen I und IV gebildet wird (Changela et al., 2001; Perry und Mondragon, 2003).

Die Struktur des N-terminalen Fragmentes (Aminosäuren 2-590) der *E. coli* Topoisomerase I ermöglichte die Ableitung eines Modells für die katalytische Reaktion (Abb. 1.3b): Im ersten Schritt bindet das Enzym in seiner „geschlossenen Konformation“ einen Einzelstrangbereich des DNA-Substrates (Abb. 1.3b, Schritt 1). Das aktive Tyrosin 319 wird durch die Spaltung dieses Stranges kovalent mit dem 5'-Phosphatrest an einem Ende des gespaltenen Stranges verknüpft. Das andere Ende verbleibt nicht-kovalent gebunden in der Substratbindespalte, die von den Domänen I und IV gebildet wird. Eine Konformationsänderung des Enzyms führt nun zu einer Trennung der Domänen I und III (Abb. 1.3b, Schritt 2). Durch diese Konformationsänderung wird das Enzym in seine „offene Konformation“ überführt und es erfolgt die räumliche Trennung der Enden des gespaltenen DNA-Stranges. Der intakte DNA-Strang wird nun zwischen den Enden des gespaltenen Stranges hindurch in die zentrale Öffnung des Enzyms geführt (Abb. 1.3b, Schritt 3). Nach einer erneuten Konformationsänderung des Enzyms wird der gespaltene DNA-Strang wieder verknüpft. (Abb. 1.3b, Schritt 4). Das Enzym muss sich nun noch einmal öffnen und schließen, um das Produkt zu entlassen und den Reaktionszyklus zu beenden (Abb. 1.3b, Schritt 5). Aufgrund hoher Aminosäuresequenzhomologie der Domänen I-IV mit anderen Typ IA Topoisomerasen und der strukturellen Ähnlichkeit mit Topoisomerase III (Mondragon und DiGate, 1999) und Reverser Gyrase (Rodriguez und Stock, 2002) wird angenommen, dass das postulierte Modell für den Reaktionsmechanismus der gesamten Enzymfamilie gültig ist.

Während die bekannten Strukturen ein klares Bild der ca. 600 Aminosäuren umfassenden N-terminalen Region bakterieller Topoisomerasen I vermitteln, ist nur wenig über den C-terminalen Bereich dieser Enzyme bekannt. Innerhalb der Enzymfamilie variiert diese Region stark bezüglich Länge und Sequenz (Caron und Wang, 1994). Eine Gemeinsamkeit bakterieller Topoisomerasen I ist das häufige Vorkommen von Zink-Bindemotiven in dieser Region. Die Anzahl dieser Motive variiert bei den bisher beschriebenen Enzymen zwischen eins und fünf (Grishin, 2000). Die C-terminale Region inklusive der Zink-Bindemotive fehlte in dem verkürzten Protein, das für die Kristallisation und Strukturlösung der *E. coli* Topoisomerase I verwendet wurde (Lima et al., 1993; Lima et al., 1994). Obwohl das verkürzte Protein in der Lage ist, DNA zu spalten, ist die Fähigkeit negativ superspiralisierte DNA zu entspiralisieren stark beeinträchtigt (Lima et al., 1993). Es wurde vermutet, dass die Zink-Bindemotive

## 1 Einleitung

---

an Substratbindung, Strangpassage oder an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Ahumada und Tse-Dinh, 2002; Cheng et al., 2003; Zhu et al., 1995). Die genaue Funktion dieser Elemente ist unbekannt, da Informationen fehlen, die eine Aussage über die Struktur der Zink-Bindemotive selbst und deren Anordnung im Verhältnis zum Rest des Proteins zulassen.

### 1.2.4 Topoisomerase I aus *Thermotoga maritima*

Das anaerobe Eubakterium *Thermotoga maritima* kann bei Temperaturen von bis zu 90°C leben (Huber et al., 1986). Zusammen mit *Aquifex* (Huber et al., 1992) ist *T. maritima* eines der thermophilsten Eubakterien, die bisher beschrieben wurden. Generell ist für thermophile Organismen die Regulation der DNA-Topologie besonders wichtig, da bei hohen Temperaturen die Öffnung der DNA-Doppelhelix begünstigt ist (Forterre et al., 1996). *T. maritima* besitzt drei Topoisomerasen, die die superhelikale Dichte der DNA kontrollieren. Neben einer Typ II Topoisomerase, die homolog zur *E. coli* Gyrase ist, wurden für *T. maritima* zwei Topoisomerasen vom Typ IA beschrieben: Die Reverse Gyrase ist in der Lage, unter ATP-Verbrauch positive Superhelices in die DNA einzuführen (Bouthier de la Tour et al., 1998). Homologe Proteine sind häufig in hyperthermophilen Archebakterien zu finden (Bouthier de la Tour et al., 1990). Die Topoisomerase I, mit der sich die vorliegende Arbeit beschäftigt, katalysiert analog zur *E. coli* Topoisomerase I die Entwindung von negativ superspiralierter DNA (Bouthier de la Tour et al., 1995; Viard et al., 2001). Die Topoisomerase I aus *T. maritima* ist außerdem eine effiziente Dekatenase (Viard et al., 2001). Da *T. maritima* ein Topoisomerase III-Äquivalent fehlt (Nelson et al., 1999), wird angenommen, dass in *T. maritima* die Topoisomerase I auch für eine effiziente Auflösung von DNA-Katenanen nach der Replikation zuständig ist (Viard et al., 2001). Im Gegensatz zu hyperthermophilen Archebakterien ist die episomale DNA in *T. maritima* wie in *E. coli* negativ superspiralisiert (Akimkina et al., 1999; Guipaud et al., 1997; Lopez-Garcia und Forterre, 1997). Es wird daher angenommen, dass die superhelikale Dichte der DNA in *T. maritima* durch Topoisomerase I und die beiden Gyrasen in ähnlicher Weise wie in mesophilen Bakterien reguliert wird. Um eine Verwechslung der verschiedenen Enzyme zu verhindern, werden im folgenden Topoisomerase I aus *T. maritima* mit TmTop I, Topoisomerase I aus *E. coli* mit EcTop I und Topoisomerase III aus *E. coli* mit EcTop III bezeichnet.



Die vom *topA*-Gen kodierte TmTop I besteht aus 633 Aminosäuren und weist wichtige Gemeinsamkeiten mit dem homologen *E. coli*-Enzym auf: Erstens binden beide Proteine Einzelstrangregionen des DNA-Substrates (Dekker et al., 2002). Zweitens entsteht durch die Spaltung des Einzelstranges eine kovalente Verbindung zwischen einem katalytisch aktiven Tyrosin im aktiven Zentrum und der 5'-Phosphatgruppe des gespaltenen DNA-Stranges (Viard et al., 2001). Drittens liegt die Spaltstelle präferenziell vier Basen in 3'-Richtung eines Cytosins (Dean und Cozzarelli, 1985; Viard et al., 2001).

Aufgrund der außerordentlich hohen Entspiralisierungsaktivität der TmTop I, die 100 bis 200-fach höher ist als bei EcTop I (Viard et al., 2001), wurde zunächst das für Typ IB Topoisomerasen geltende mechanistische Modell diskutiert. Dieses Modell postuliert, dass nach der Spaltung eines DNA-Einzelstranges ein freies Ende dieses Stranges um den intakten Strang rotieren kann und so eine Entspiralisierung des Moleküls erfolgt. Da die Reaktion vom Enzym genau kontrolliert werden muss, spricht man von einem kontrollierten Strang-Rotations-Modell (Stewart et al., 1998). Die Entspiralisierungsreaktion mittels Strang-Rotations-Modell erfolgt in der Regel mit einer höheren Geschwindigkeit als die Reaktion nach dem für Typ IA Topoisomerasen postulierten „Enzym-Brücken-Modell“ (Abb. 1.3) und könnte so die hohe Aktivität von TmTop I erklären. Untersuchungen von Entspiralisierungsreaktionen an DNA-Einzelmolekülen zeigten aber, dass die Verwindungszahl der DNA durch die Aktivität der TmTop I wie bei EcTop I bei jedem Reaktionszyklus um eins verändert wird (Dekker et al., 2002; Dekker et al., 2003). Dies entspricht dem „Enzym-Brücken-Modell“. In der aktuellen Literatur wird daher angenommen, dass TmTop I nach diesem Mechanismus arbeitet und die hohe Prozessivität des Enzyms andere Ursachen hat.

Während die N-terminalen Regionen von TmTop I (Aminosäuren 1-540) und EcTop I (Aminosäuren 1-580) eine hohe Sequenzhomologie (40 % Aminosäureidentität) aufweisen, sind die Hauptunterschiede im C-Terminus der Enzyme zu finden. Das *E. coli* Enzym besitzt mit einer Länge von 268 Aminosäuren eine recht große C-terminale Domäne, bei *T. maritima* besteht diese Domäne lediglich aus 93 Aminosäuren. Im Gegensatz zu EcTop I, das drei funktionelle Zink-Bindestellen aufweist (Grishin, 2000), besitzt TmTop I in dieser Region nur ein einziges Zink-Bindemotiv (Viard et al., 2001). Um die Funktion dieses Zink-Bindemotivs in TmTop I näher zu untersuchen, wurde ein verkürztes Protein hergestellt, das nur aus den ersten 540 Aminosäuren besteht. Das Enzym, dem das Zink-Bindemotiv somit fehlt, besitzt eine stark reduzierte Entspiralisierungsaktivität. Durch biochemische Analysen konnte nachgewiesen

## 1 Einleitung

---

werden, dass dies wahrscheinlich auf eine ineffiziente Bindung des DNA-Substrates zurückzuführen ist (Viard et al., 2004). Überraschenderweise haben Aminosäureaustausche innerhalb des Zink-Bindemotivs des intakten Enzyms, die zu einem Verlust des Zink-Ions führen, keinen Einfluss auf die Entspiralisierungsaktivität. Nähere Untersuchungen zeigten, dass das so veränderte Enzym weiterhin in der Lage ist, DNA zu spalten und Dekatenierungsreaktionen auszuführen (Viard et al., 2001). Die Aminosäureaustausche scheinen weder einen Einfluss auf die Substratspezifität noch auf die DNA-Spaltungsreaktion zu haben. Generell verhielt sich die Mutante in den durchgeführten Experimenten genau wie das Wildtyp-Protein (Viard et al., 2001). Im Gegensatz dazu führt in EcTop I der Verlust von Zink-Ionen zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms (Tse-Dinh und Beran-Steed, 1988). Eine Punktmutation innerhalb des zweiten Zink-Bindemotivs verändert die Effizienz und Spezifität der DNA-Spaltungsreaktion (Zhu et al., 1995). Eine verkürzte EcTop I, die nur den bei Topoisomerasen I konservierten N-Terminus enthält, ist im Gegensatz zu TmTop I nicht in der Lage, negativ superspiralisierte DNA zu relaxieren (Lima et al., 1993). In TmTop I trägt die C-terminale Domäne zusätzlich zur Thermostabilität des Enzyms bei (Viard et al., 2004). Die genaue Funktion der C-terminalen Domäne bei der katalytischen Reaktion von TmTop I ist weitgehend unbekannt.

## 1.3 Serinproteasen

### 1.3.1 Katalytischer Mechanismus von Serinproteasen

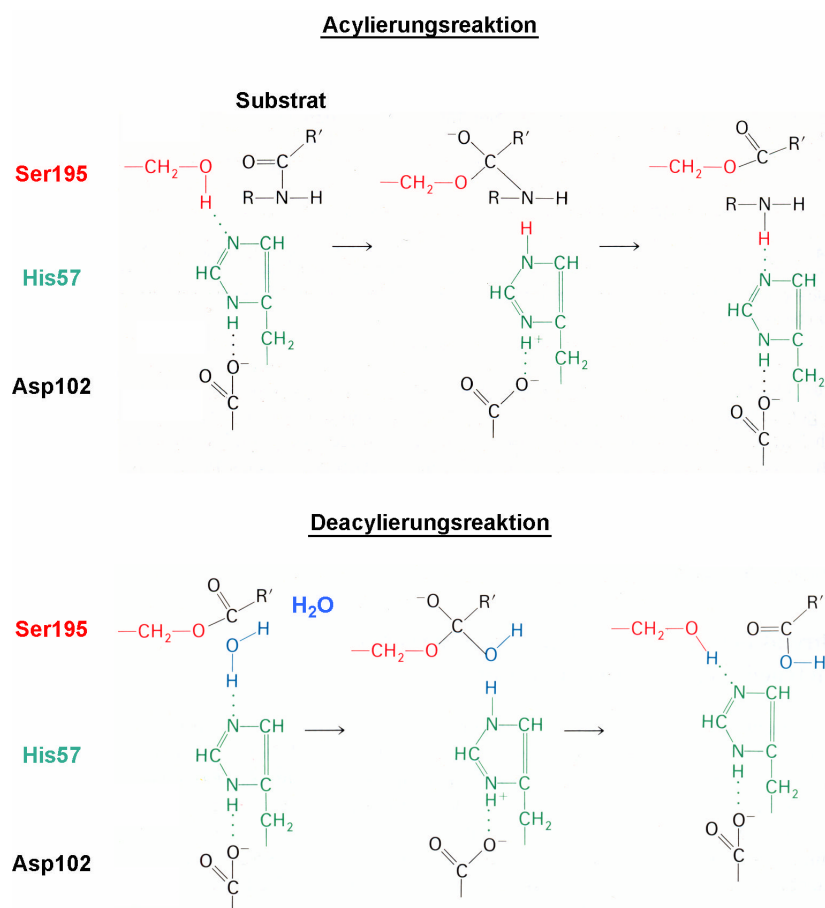
Die am besten untersuchte Klasse von Proteasen ist die Familie der Serinproteasen. Im menschlichen Körper nimmt diese Enzymklasse vielfältige Aufgaben wahr. Serinproteasen wie Trypsin und Chymotrypsin spalten ein breites Spektrum an Peptiden und Proteinen und sind als Verdauungsenzyme wirksam. Andere Serinproteasen, wie das Blutgerinnungsenzym Thrombin, sind hochgradig spezifisch und spalten nur ganz bestimmte Substrate. Beim katalytischen Mechanismus spielt die Seitenkette eines Serins im aktiven Zentrum des Enzyms eine entscheidende Rolle, daher der Name der Enzymklasse. Dieses Serin wird während der katalytischen Reaktion vorübergehend kovalent an das Substrat gebunden und zeichnet sich durch eine außergewöhnlich hohe Reaktivität aus. Von einer ganzen Reihe von Serinproteasen sind inzwischen 3D-Strukturen bekannt. Neben den Strukturen von Chymotrypsin und Trypsin wurden auch Enzyme der Blutgerinnungskaskade wie Thrombin und Faktor Xa aufgeklärt. Ein Vergleich der Strukturen zeigt eine außerordentliche Ähnlichkeit der aktiven Zentren. Die Nummerierung der Aminosäuren von neu entdeckten Serinproteasen bezieht sich meist auf die erste Chymotrypsin-Struktur (Schechter und Berger, 1967).

Charakteristisch für Serinproteasen ist die sogenannte katalytische Triade bestehend aus den Aminosäuren Ser195-His57-Asp102. Da diese drei Aminosäuren in der Sequenz weit voneinander entfernt liegen, muss sich das Protein so falten, dass die Seitenketten in räumliche Nähe zueinander gelangen. Der eigentliche Angriff auf die zu spaltende Peptidbindung erfolgt durch das Ser195. Da die Hydroxylgruppe dieses Restes für einen nucleophilen Angriff auf den Carbonylkohlenstoff nicht reaktiv genug ist, muss seine Nucleophilie durch die benachbarte Seitenkette des His57 zunächst erhöht werden. Das Histidin ist in der Lage das Proton der Serin-Hydroxylgruppe zu abstrahieren. Das so aktivierte negativ geladene Ser195 kann nun das eher positive Zentrum der Amid-Carbonylgruppe des Substrates nucleophil angreifen. Das benachbarte Asp102 kann ein Proton des His-Imidazolrings aufnehmen und im Verlauf der Reaktion wieder abgeben. Zusätzlich hält Asp102 das His57 in der richtigen Orientierung und stellt sicher, dass es sich in der geeigneten tautomeren Form zur Aufnahme eines Protons von Ser195 befindet. Der erste Reaktionsschritt, der den

## 1 Einleitung

---

Angriff auf die Carbonylgruppe des Substrates beinhaltet, zeichnet sich durch die Bildung eines Acyl-Enzym-Intermediates aus und wird daher als *Acylierung* (Abb. 1.4) bezeichnet. Zur Stabilisierung des Übergangszustandes verfügen Serinproteasen über ein weiteres charakteristisches Strukturmotiv, das sogenannte *oxanion-hole*. Es handelt sich dabei um eine kleine Tasche in der Nähe von Ser195, die von mehreren NH-Gruppen gebildet wird. Das *oxanion-hole* ist in der Lage, die negative Ladung des Carbonylsauerstoffes während des Übergangszustandes zu stabilisieren. Der Übergangszustand zeichnet sich durch die Bildung eines tetraedrischen Zwischenproduktes aus. Im folgenden wird ein Proton des His57 auf das Stickstoffatom der Peptidbindung übertragen und so die Bindung gespalten. Die Aminkomponente kann nun abdiffundieren und das aktive Zentrum des Enzyms verlassen. Im zweiten Reaktionsschritt wird das Enzym unter Freisetzung der Produkte regeneriert. Dieser Schritt, der als *Deacylierung* (Abb. 1.4) bezeichnet wird, erfordert die Hydrolyse des Acyl-Enzym-Intermediates. Dabei nimmt ein Wassermolekül den Platz der Aminkomponente ein. His57 zieht ein Proton dieses Wassermoleküls ab und ermöglicht so den nucleophilen Angriff auf das Carbonylkohlenstoffatom der an Ser195 gebundenen Acylgruppe. Die Freisetzung der sauren Komponente des Produktes erfolgt nach Übertragung des Protons auf die Hydroxylgruppe von Ser195 (Stryer, 2000).



**Abb. 1.4:** Katalytischer Mechanismus der Serinproteasen. Abbildung modifiziert nach Stryer (2000).

Für Proteasen im allgemeinen wurde eine Nomenklatur entwickelt, die die genaue Beschreibung der Interaktionen zwischen Substrat und Enzym ermöglicht (Schechter und Berger, 1967). Mit Hilfe dieses Systems lassen sich die Aminosäuren des Peptidsubstrates den Bindetaschen im aktiven Zentrum der Protease zuordnen. Der Konvention nach werden Bindetaschen des Proteins mit S (engl. *subsites*) und Aminosäurereste des Peptidsubstrates mit P (engl. *peptide*) bezeichnet. Die N-terminal von der zu spaltenden Peptidbindung gelegenen Aminosäuren werden mit P1, P2, P3 usw. gekennzeichnet, die C-terminal gelegenen mit P1', P2', P3' usw. Die Aminosäurereste P1 und P1' befinden sich in diesem Schema in direkter Nachbarschaft der zu spaltenden Peptidbindung. Die entsprechenden Bindetaschen des Enzyms werden mit S1, S2, S3, usw. beziehungsweise S1', S2', S3' bezeichnet.

## 1 Einleitung

---

### 1.3.2 Humane neutrophile Elastase und mit dem Enzym verbundene Krankheitsbilder

Die humane neutrophile Elastase (HNE; EC 3.4.21.37) ist eine Serinprotease der Trypsinfamilie, die gemeinsam mit andere Proteasen in humanen neutrophilen Granulozyten vorkommt. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 1968 konnte Janoff et al. HNE als Elastin abbauendes Enzym charakterisieren (Janoff und Scherer, 1968). HNE ist ein stark basisches Glykoprotein mit einem isoelektrischen Punkt nahe 9 (Taylor und Tloutan, 1978) und einem Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa (Barrett, 1981). Die Aminosäuresequenz des Enzyms wurde durch Kombination von Peptidsequenzierung (Sinha et al., 1987) und Röntgenstrukturanalyse (Bode et al., 1986) ermittelt. HNE besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette von 218 Aminosäuren Länge. Die Kette beinhaltet vier Disulfidbrücken und zwei N-glykosidisch gebundene Oligosaccharideinheiten. HNE wird in Form verschiedener Isoenzyme synthetisiert, die sich bezüglich ihres Kohlenhydratanteils voneinander unterscheiden (Sinha et al., 1987). Durch eine später durchgeführte Analyse der c-DNA des Proteins (Farley et al., 1988; Takahashi et al., 1988) konnte ein zusätzlicher Bereich von 20 Aminosäuren am C-Terminus der HNE identifiziert werden, der aber wahrscheinlich durch posttranslationale Modifikation entfernt wird. HNE besitzt eine ausgeprägte Substratspezifität und spaltet bevorzugt Val-X-Bindungen. Die von der Elastase aus Schweinepankreas (engl. *porcine pancreatic elastase*, PPE) bevorzugten Ala-X-Bindungen werden von HNE nur in geringem Maße gespalten (Harris et al., 2000). HNE wird vom Körper in der Lunge freigesetzt, um dort abgestorbenes Gewebe und eingedrungene Bakterien zu zerstören. Es ist in der Lage, eine Reihe unterschiedlicher Proteine der extrazellulären Matrix abzubauen, wie Typ III und Typ IV Kollagen, Fibronectin, Laminin und verschiedene Proteoglykane (Mainardi et al., 1980; McDonald und Kelley, 1980; McGowan und Murray, 1987). Durch den Abbau dieser Proteine unterstützt HNE die Aufrechterhaltung der Struktur und Elastizität der Alveolarwand der Lunge. (Bieth, 1986; Werb et al., 1982). Eine übermäßige Freisetzung von HNE kann zu schwerwiegenden Beschädigungen des Lungengewebes führen, wie es bei Lungenemphysemen, chronischer Bronchitis, cystischer Fibrose, ARDS (engl. *adult respiratory distress syndrome*) zu beobachten ist (Jackson et al., 1984; Janoff, 1985; Leung et al., 2000; Merritt et al., 1983; Ohmoto et al., 2001; Piccioni et al., 1992; Powers, 1983; Veale et al., 1997). Es ist bekannt, dass HNE zusätzlich zum Einwandern von Neutrophilen in entzündete Geweben beiträgt (Sandhaus, 1987).

Eine Gruppe von Erkrankungen, die primär auf das Rauchen von Zigaretten zurückzuführen ist, wird mit dem Krankheitsbild COPD (engl. *chronic obstructive pulmonary disease*) bezeichnet (Grygotis, 2000). Es ist durch einen zunehmenden Verschluss der Atemwege und chronische Bronchitis gekennzeichnet. COPD ist die vierthäufigste Todesursache (WHO, 2003) und betrifft 4 - 6 % aller Menschen älter als 45 Jahre. Die Therapie dieser Krankheit hat sich über die letzten drei Jahrzehnte nicht entscheidend verändert und besteht zumeist in der Anwendung von Medikamenten, die die blockierten Atemwege öffnen und Cortikosteroiden, um entstehende Entzündungen zu bekämpfen.

Die chronische Entzündung des Lungengewebes, die durch Zigarettenrauch und andere Reizstoffe ausgelöst wird, ist der Hauptgrund für das Fortschreiten der Erkrankung. Diese Entzündung wird unter anderem durch die Ausschüttung von Cytokinen durch Zellen des Immunsystems ausgelöst und weiter verstärkt. Dadurch werden Neutrophile aus dem Blut in die Lunge gelockt, die durch ihre Konzentration ihrerseits nun Makrophagen anziehen. Neutrophile und Makrophagen sekretieren nun HNE, Proteinase 3, Matrix-Metalloproteasen und andere Proteasen, die im Normalfall für eine Zerstörung eingedrungener Bakterien und anderer Mikroorganismen und den Abbau von totem oder beschädigtem Gewebe sorgen. Der Körper schüttet im Gegenzug antiproteolytisch wirkende Substanzen aus, die die Beschädigung des empfindlichen, intakten Lungengewebes verhindern. Eine der wichtigsten antiproteolytischen Substanzen ist das  $\alpha_1$ -Antitrypsin, welches HNE neutralisiert. Die vorherrschende Theorie zur Entstehung von Lungenemphysemen basiert auf einer Verschiebung der Balance zwischen Protease und Inhibitor zu Gunsten der Proteolyse. Diese Verschiebung wird unter anderem durch Substanzen im Zigarettenrauch ausgelöst, die eine essentielle Methionin-Seitenkette des körpereigenen  $\alpha_1$ -Antitrypsins oxidieren und damit den Inhibitor inaktivieren. Die Folge ist eine unkontrollierte Zerstörung des Lungengewebes durch HNE, besonders des Elastins, das die Alveolarwände auskleidet (Barnes, 2000; Bieth, 1986; Gadek et al., 1981; Grygotis, 2000; Janoff, 1985; Werb et al., 1982). Die Zerstörung verursacht eine Vereinigung unterschiedlicher Lungenbläschen und führt zum Kollaps der Bronchiolen, zu einer verringerter Elastizität der Lunge und schließlich zum Luftwegsverschluss (Barnes, 2000; Grygotis, 2000).

## 1 Einleitung

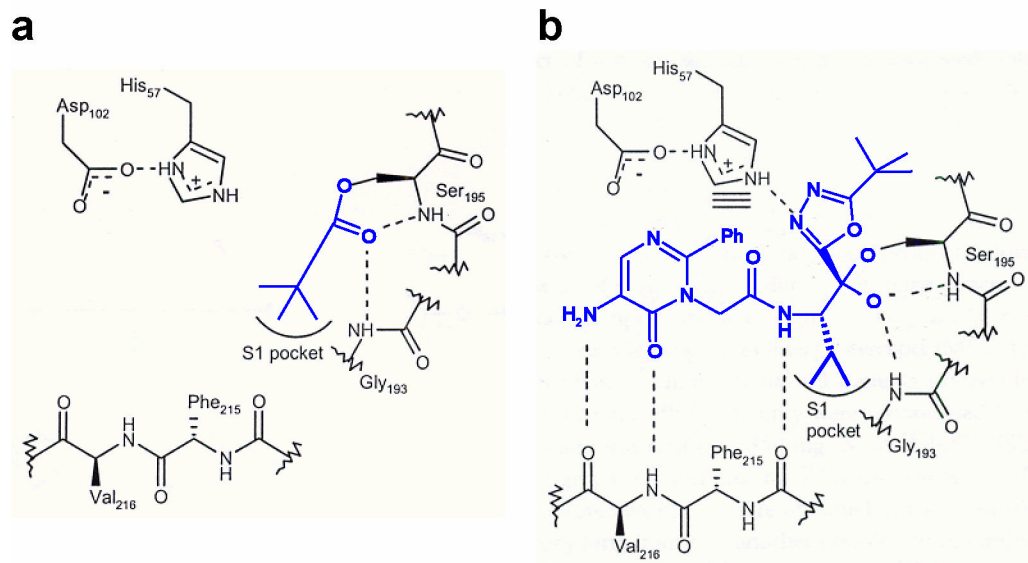
---

### 1.3.3 Inhibitoren der HNE

Die entscheidende Bedeutung der HNE während Entstehung und Verlauf der Krankheit macht das Enzym zu einem wichtigen Zielmolekül für die Entwicklung einer COPD-Therapie. So wird von einem starken, selektiven und oral verfügbaren HNE-Inhibitor erwartet, die fortschreitende Zerstörung der Lunge bei COPD-Patienten aufzuhalten (Bernstein et al., 1994; Edwards und Bernstein, 1994). Eine effektive Hemmung von HNE sollte zu einer Verringerung der Konzentration entzündungsfördernder Cytokine führen und die direkte Zerstörung des Lungengewebes durch HNE aufhalten (Grygotis, 2000; Janoff, 1985; Leung et al., 2000; Ohbayashi, 2002; Ohmoto et al., 2001; Powers, 1983; Veale et al., 1997). Im folgenden werden die drei wichtigsten HNE-Inhibitor-Klassen vorgestellt, die aufgrund dieser Krankheitshypothese entwickelt wurden.

Acyl-Enzym-Inhibitoren verhalten sich grundsätzlich wie HNE-Substrate, bilden aber nach der Spaltung des Inhibitormoleküls einen stabilen Komplex mit dem Enzym aus. Die Hydroxylgruppe des katalytischen Ser195 greift ein reaktives Carbonylkohlenstoff des Inhibitormoleküls an und bildet einen tetraedrischen Übergangszustand aus. Im folgenden kollabiert dieser Übergangszustand, es bildet sich ein stabiler Acyl-Enzym-Komplex und das abgespaltene Inhibitorfragment verlässt das aktive Zentrum des Enzyms. Da der Acyl-Enzym-Komplex eine weitere proteolytische Aktivität der HNE verhindert, wird das Enzym irreversibel inhibiert (Abb. 1.5a). Ein Beispiel für diese Klasse von HNE-Inhibitoren ist der von Ono Pharmaceutical entwickelte Inhibitor ONO-5046 (Kawabata et al., 1991).





**Abb. 1.5:** Wechselwirkungen zwischen Elastase und synthetischen Inhibitoren. Inhibitoren (b) und Inhibitorfragmente (a) sind blau markiert, Wasserstoffbrücken werden durch gestrichelte Linien dargestellt. **(a)** Acyl-Enzym-Komplex im Übergangszustand nach Spaltung des Acyl-Enzym-Inhibitors ONO-5046. **(b)** Bindung von Übergangszustands-Inhibitoren im aktiven Zentrum der Elastase. Abbildung modifiziert nach Ohbayashi et al. (2002).

Eine zweite, insgesamt besser charakterisierte Klasse von HNE-Inhibitoren zeichnet sich durch die Bildung eines stabilen Komplexes aus, der dem tetraedrischen Übergangszustand während der enzymatischen Spaltung eines Peptidsubstrates ähnelt. Diese Substanzen werden deshalb als Übergangszustands-Inhibitoren bezeichnet (Ohbayashi, 2002). Nach dem nucleophilen Angriff des Ser195 auf ein Keto-Carbonylkohlenstoff wird ein Halbacetal gebildet. Das negativ geladene Sauerstoffatom dieses Halbacetals ist dabei im *oxanion-hole* lokalisiert und interagiert über Wasserstoffbrücken mit zwei Amidgruppen der Proteinhauptkette. Im Gegensatz zum Substrat können diese Inhibitoren aber nicht gespalten werden. Die Bildung eines stabilen Komplexes verhindert die weitere Hydrolyseaktivität der HNE. Zu dieser Klasse von HNE-Inhibitoren sind auch Trifluoromethylketon-Verbindungen ( $R-COF_3$ ) zu rechnen. Ausgehend von der Aminosäuresequenz eines HNE-Substrates konnten potente peptidischen Elastase-Inhibitoren identifiziert werden, die ein Trifluoromethylketon beinhalten (Imperiali und Abeles, 1986). Die röntgenkristallographische Untersuchung eines Inhibitor-Komplexes ( $Ac-Ala-Pro-Ala-CF_3$ ) mit der verwandten Elastase aus Schweinepankreas (PPE) zeigte, dass die Trifluoromethylgruppe die Ausbildung einer stabilen Bindung zwischen einer

## 1 Einleitung

---

benachbarten Carbonylfunktion und dem katalytischen Ser195 ermöglicht (Meyer et al., 1986). Eine Erklärung für die Stabilität des Adduktes ist eine stärkere Bindung des Halbacetal-Sauerstoffatoms, das durch die Trifluoromethylgruppe azider gemacht wird (Imperiali und Abeles, 1986). Neben der Bildung eines Halbacetals mit Ser195 interagieren diese Inhibitoren zusätzlich mit dem Enzym über eine  $\beta$ -faltblatt-ähnliche Konformation. Dabei werden zwei Wasserstoffbrücken zum Val216 ausgebildet, die den Komplex weiter stabilisieren. Die wichtigste Information aus der Röntgenstruktur war die Kenntnis derjenigen funktionellen Gruppen des Inhibitors, die direkt mit dem Enzym wechselwirken und deren räumliche Anordnung. Im folgenden wurde nun versucht, nicht-peptidische Strukturen zu entwickeln, die die gleichen Wechselwirkungen wie peptidische Inhibitoren ausbilden. Die daraufhin untersuchte Substanzklasse der Pyrimidone vereinigte die günstigen Wechselwirkungen des peptidischen Inhibitors mit einer hohen Bioverfügbarkeit und einer ausreichenden Spezifität. Die Komplexstruktur eines Pyrimidoninhibitors mit PPE zeigte, dass die Substanz neben der kovalenten Bindung mit Ser195 analog zum peptidischen Inhibitor zwei Wasserstoffbrücken zu Val216 ausbildet (Veale et al., 1995). Das substituierte Pyrimidon stellt hier das Donor-Akzeptor-Paar zur Ausbildung der Wasserstoffbrücken zur Verfügung. In Abb. 1.5b sind die Interaktionen eines Übergangszustands-Inhibitors dargestellt, der ein Pyrimidon enthält.

Neben den zwei beschriebenen kovalent bindenden Inhibitorclassen, den Acyl-Enzym-Inhibitoren und den Übergangszustands-Inhibitoren, wurden in der Vergangenheit umfangreiche Untersuchungen mit nicht-kovalent bindenden Peptid-Inhibitoren durchgeführt (Dimicoli und Bieth, 1978; Dimicoli et al., 1976; Lestienne et al., 1977; Lestienne et al., 1979; Renaud et al., 1983). Trifluoroacetyl-Peptide (TFA-Peptide) stellen eine wichtige Klasse potenter, reversibler Elastase-Inhibitoren dar, die  $K_i$ -Werte von  $10^{-6}$  -  $10^{-8}$  M aufweisen (Renaud et al., 1983). Das N-terminal substituierte Peptid TFA-Val-Tyr-Val-OH besitzt eine hohe Affinität für PPE und HNE von 0,56  $\mu$ M bzw. 0,5 mM (Dimicoli und Bieth, 1978). Interessanterweise konnten mit Hilfe von Kristallstrukturen verschiedener TFA-Peptide im Komplex mit PPE insgesamt vier unterschiedliche Bindungsmodi für diese Inhibitorclassen identifiziert werden (Mattos et al., 1994). In PPE scheint die Bindung von TFA-Peptiden sowohl von der Aminosäuresequenz als auch von weiteren C-terminal gelegenen Substituenten abzuhängen (Mattos et al., 1995). Obwohl TFA-Val-Tyr-Val-OH kommerziell erhältlich ist und als HNE-Inhibitor eingesetzt wird, existiert bisher keine Röntgenkristallstruktur des Komplexes, die den genauen Bindungsmodus des Inhibitors beschreibt.

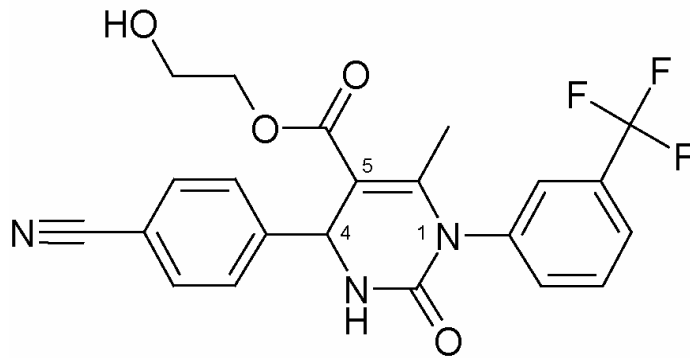
Trotz der unbestrittenen medizinischen Bedeutung des Enzyms und vieler biochemisch charakterisierter Inhibitoren (Leung et al., 2000; Ohbayashi, 2002; Powers, 1983) sind insgesamt nur wenige Röntgenkristallstrukturen der HNE verfügbar. Die erste aufgeklärte HNE-Struktur zeigt das Enzym im Komplex mit einem Protein-Protease-Inhibitor (Fragment des *turkey ovomucoid inhibitors*, OMTKY3), der eine Länge von 56 Aminosäuren aufweist (Bode et al., 1986). Viele natürliche Protein-Protease-Inhibitoren binden in gleicher Weise wie gute Substrate und bilden extrem stabile Komplexe mit dem Enzym. Im Gegensatz zum Substrat bleibt in diesen Komplexen die Peptidbindung des Inhibitors im aktiven Zentrum der Protease stabil oder wird nur sehr langsam gespalten (Huber und Bode, 1978; Laskowski und Kato, 1980). Bislang wurden vier Komplexe der HNE mit kleinen organischen Inhibitormolekülen beschrieben, die alle kovalent an das aktive Ser195 binden, (Cregge et al., 1998; Macdonald et al., 2002; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988). Diese vier Substanzen gehören zur Klasse der Übergangszustands-Inhibitoren. Drei der Kleinmolekül-Inhibitoren besitzen eine peptidische Grundstruktur (Cregge et al., 1998; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988), der von Macdonald et al. (2002) beschriebene Inhibitor ist ein Pyrrolidin-Translactam-Derivat. Um Struktur-Wirkungsbeziehungen verschiedener Inhibitoren zu analysieren, wurden in der Literatur oft Komplexe mit PPE verwendet (Cregge et al., 1998; Ohmoto et al., 2001; Veale et al., 1995). Dieser Ansatz ist allerdings als problematisch zu beurteilen, da die relativ geringe Sequenzhomologie zwischen HNE und PPE (40%) und eine Reihe von Aminosäureaustausche in den aktiven Zentren der beiden Enzyme zu falschen Annahmen bezüglich der Bindung der Inhibitoren führen kann. Trotz einer großen Anzahl synthetisierter HNE-Inhibitoren besitzen bisher nur wenige Substanzen das Potential, bis zur klinischen Anwendung weiterentwickelt zu werden (Ohmoto et al., 2001). Während peptidische Trifluoromethylketone im allgemeinen nicht oral verfügbar sind und nur kurze biologische Halbwertszeiten besitzen, hemmen viele andere Substanzen neben der Elastase auch andere Serinproteasen wie Chymotrypsin. Andere HNE-Inhibitoren befinden sich momentan in der klinischen Prüfung und es bleibt abzuwarten, ob diese Substanzen als Arzneimittel zugelassen werden (Ohmoto et al., 2001).

## 1 Einleitung

---

### 1.3.4 Entwurf eines neuen HNE-Inhibitors

In einem von der BayerHealthCare AG durchgeführten *High Throughput Screening* konnte eine neue Leitstruktur identifiziert werden, die zur Synthese potenter, nicht-kovalent bindender HNE-Inhibitoren führte. Ein besonders starker Inhibitor aus dieser Klasse ist das Molekül mit der Bezeichnung WO24700 (Abb. 1.6). Mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Substrate konnte für diesen Inhibitor experimentell ein  $IC_{50}$ -Wert von 6 nM bestimmt werden.



**Abb. 1.6:** Chemische Struktur des Inhibitors WO24700. (4R)-2-Hydroxyethyl 4-(4-cyanophenyl)-6-methyl-2-oxo-1-[3 (trifluoromethyl)phenyl]-1,2,3,4-tetrahydro-5-pyrimidinecarboxylat

Das Grundelement dieser Strukturklasse ist ein zentraler substituierter Pyrimidinring. Die wichtigsten Substituenten des Pyrimidins sind ein Trifluoromethylphenyl-Rest an Position 1, ein Cyanophenyl-Rest an Position 4 und ein Hydroxyethylcarboxylat an Position 5 des Rings (Abb. 1.6). Um die Selektivität des Inhibitors zu analysieren, wurde die Inhibition der Proteolyse der HNE mit einer Reihe anderer Serinproteasen verglichen. WO24700 zeigte bis zur höchsten verwendeten Konzentration von 10  $\mu$ M keine Inhibition von Chymotrypsin, Trypsin, Chymase, Cathepsin G, Plasmin, Thrombin, Kallikrein (Schweinepankreas), Kallikrein (Mensch) oder PPE und kann somit als hochselektiv gelten. Die gesamte Strukturklasse wurde durch das Patent WO2004/24700 geschützt.

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Promotionsarbeit wurde im Rahmen einer Kooperation des Instituts für Biochemie, Arbeitsgruppe Prof. Schomburg und der BayerHealthCare AG, Abteilung Enabling Technologies durchgeführt. Im Verlauf der Arbeit sollten zwei Projekte der BayerHealthCare AG durch röntgenkristallographische Untersuchungen unterstützt werden.

Im ersten Projekt sollte die Struktur einer bakteriellen Topoisomerase aufgeklärt werden. Diese Enzyme stellen wichtige Zielmoleküle für medizinische Wirkstoffe dar. Durch die Strukturaufklärung der bakteriellen Topoisomerase I aus *E. coli* durch die Arbeitsgruppe von Alfonso Mondragon (Lima et al., 1994) konnten bereits wichtige Informationen zum Mechanismus der Enzymklasse gewonnen werden. Da die C-terminale Region des Enzyms in dieser Struktur aber fehlt, war der Entwurf eines vollständigen Modells der katalysierten Reaktion bisher nicht möglich.

Für die Strukturaufklärung im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die **Topoisomerase I aus *T. maritima*** ausgewählt. Zum einen lassen sich erfahrungsgemäß Proteine aus thermophilen Organismen leichter kristallisieren als homologe Proteine aus mesophilen Bakterien, zum anderen wurde vermutet, dass der im Vergleich zu EcTop I verkürzte C-terminale Bereich in TmTop I die Kristallisation des gesamten Proteins ermöglichen könnte. TmTop I sollte zunächst kloniert, rekombinant exprimiert, aufgereinigt und anschließend auf biochemische Aktivität hin untersucht werden. Im Verlauf der Arbeit sollten Kristallisationsexperimente durchgeführt werden, um eine Bedingung zu identifizieren, unter der sich geeignete Kristalle herstellen lassen. Durch anschließende Diffraktionsmessungen und die Auswertung der erhaltenen Daten sollte die Struktur des Enzyms aufgeklärt werden. Im Rahmen der angestrebten Entwicklung eines Antibiotikums durch die BayerHealthCare AG sollte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis der Gesamtstruktur bakterieller Typ IA Topoisomerasen führen und so ein wichtiges pharmakologisches Zielmolekül strukturell näher charakterisieren.

In einem zweiten Projekt sollten **Inhibitor-Komplexe der humanen neutrophilen Elastase** untersucht werden, um die Entwicklung eines potenten Elastase-Inhibitors durch die BayerHealthCare AG zu unterstützen. Ziel war die Aufklärung von HNE-Komplexen mit reversiblen Inhibitoren, insbesondere die Charakterisierung des Enzym-

## 1 Einleitung

---

Komplexes mit WO24700. Um die oben geschilderte Problematik bezüglich der Komplexe von HNE-Inhibitoren mit PPE zu umgehen, sollten Inhibitorkomplexe mit der aus humanem Plasma gewonnenen HNE aufgeklärt werden. Die Arbeit sollte ein detailliertes Verständnis der Wechselwirkungen von reversiblen, nicht-kovalent bindenden Inhibitoren mit HNE ermöglichen und so wichtige Voraussetzungen für ein weiteres strukturbasiertes Wirkstoffdesign schaffen.

Das Enzym wurde vom Kooperationspartner in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. Aus der Literatur und einem ersten am Institut für Biochemie durchgeführten *screening* waren bereits verschiedene initiale Kristallisationsbedingungen der HNE bekannt. Aufgabe zu Beginn der Arbeit war die Identifikation von Kristallisationsbedingungen, die die Herstellung von Enzym-Inhibitor-Komplexen ermöglichen. Neben der Durchführung von Ko-Kristallisationsexperimenten mit verschiedenen Inhibitoren wurde auch versucht, das freie Enzym ohne Inhibitor zu kristallisieren. Kristalle der freien HNE sollten die Herstellung von Inhibitorkomplexen durch Einlegen in Lösungen mit Inhibitormolekülen ermöglichen (engl. *soaking*). Die Struktur des freien Enzyms war zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt. Die röntgenkristallographische Untersuchung von inhibitorfreien HNE-Kristallen und der Vergleich der resultierenden Struktur mit Inhibitor-Komplexen sollte zusätzlich zu neuen Erkenntnissen über den Mechanismus der Enzymhemmung führen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Chemikalien, Materialien, Geräte und EDV-Systeme

#### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, falls nicht anders angegeben, über die Firmen Merk (Darmstadt), Sigma (Deisenhofen) und Fluka (Deisenhofen) bezogen. Zur Herstellung von Lösungen wurde entionisiertes Wasser verwendet, das mit Hilfe einer Reinstwasseranlage (Seral, Ransbach-Burbach) gewonnen wurde. Sämtliche Lösungen wurden durch eine 0.2 µm-Membran filtriert.

#### 2.1.2 Materialien, Geräte und EDV-Systeme

Die wichtigsten Geräte, Materialien und EDV-Systeme sind in Tabelle 2.1, Tabelle 2.2 und Tabelle 2.3 zusammengefasst.

**Tab. 2.1: Verwendete Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Bioreaktor BioWave 50	Wave Biotech, Bridgewater, USA
Chromatographiesysteme	
Äkta Explorer	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Äkta FPLC	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
SMART	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
EDV-Systeme	
Linux Desktop PC (Suse 9.2)	Theis, Köln
SGI Octane (Irix 6.5)	Silicon Graphics, München
Elektrophorese	
Criterion Cell	BioRad, München
E-Gel Power Base	Invitrogen, Karlsruhe
Massenspektrometer	
MALDI-MS Biflex III (TOF)	Bruker, Bremen

## 2 Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Mikroskope Stemi 2000-C Leica MZ 125	Zeiss, Jena Leica, Solms
pH-Meter 766 Calimatic	Eppendorf, Hamburg
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
Röntgendiffraktometer FR 591 Flächendetektor MAC-XOS double mirror	Nonius, Delft, Niederlande MAC Science, Yokohama, Japan MAC Science, Yokohama, Japan
Rotaflex RU-200 Flächendetektor Cryostream Cooler CMF12-38Cu6 double mirror	Rigaku, Düsseldorf MAR Research, Norderstedt Oxford Cryosystems, Oxford, England Osmic, Northwood, USA
Ultraschall Desintegrator W-450	Branson, Danbury, USA
Waagen Analysenwaage FA-210-4 Laborwaage SBA 52	Faust, Köln Scaltec, Heiligenstadt
Zentrifugen RC 3B Plus und RC 5B Plus 5417 C und 5810 R	Sorvall, Newtown CT, USA Eppendorf, Hamburg

**Tab. 2.2:** Sonstige Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Bioreaktorbeutel (25 Liter)	Wave Biotech, Bridgewater, USA
Bradford Proteinassay	BioRad, München
Zelluloseacetatfilter, 0.2 µm	Sartorius, Göttingen
Chromatographie-Säulen HighTrap SP 5 ml HighTrap SP 1 ml Superdex 200 HR 26/60 Superdex 200 HR 3.2/30	Amersham, Uppsala, Schweden Amersham, Uppsala, Schweden Amersham, Uppsala, Schweden Amersham, Uppsala, Schweden
Cryoloops sonstige Cryowerkzeuge	Hampton Research, Laguna Niguel, USA Hampton Research, Laguna Niguel, USA
Filtration Steriflip, Porengröße 0.22 µm Vivaspin 500, 6, 15	Millipore, Eschborn Vivascience, Hannover



Bezeichnung	Hersteller
Gelelektrophorese Criterion 10 % Bis-Tris Gele E-Gel	BioRad, München Invitrogen, Karlsruhe
VDX Plates, 48 well, greased Crychem Plates	Hampton Research, Laguna Niguel, USA Hampton Research, Laguna Niguel, USA

**Tab. 2.3:** Computerprogramme

Programm	Literaturangabe
Auswertung von Röntgendaten	
CCP4-suite	CCP4 (1994)
CNS-suite	Brunger et al. (1998)
HKL-suite	Otwinowski & Minor (1997)
DSSP	Kabsch & Sander (1983)
ARP/wARP	Perrakis et al. (1999)
Graphikprogramme	
O	Jones et al. (1991)
Pymol	DeLano(2002)
Topdraw	Bond (2003)

## 2 Material und Methoden

---

### 2.2 Molekularbiologie

#### 2.2.1 Mikroorganismen und Medien

##### Mikroorganismen

<i>T. maritima</i> , DSM No. 10099	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Invitrogen, Carlsbad, USA Novagen, Madison, USA

##### Medien und Puffer

LB Medium	1 l: 10 g NaCl, 10 g Bacto Peptone (Becton Dickinson, Heidelberg), 5 g Hefeextrakt, Sterilisation durch Autoklavieren oder Filtration
SOC Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
TNE	100 mM Tris/HCl pH 8.0, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8
TE	10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8
Proteinase K Lösung	20 mg/ml Proteinase K, 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 5 mM CaCl <sub>2</sub>
RNAse A Lösung	10 mg/ml RNAse A in TE, für 15 min auf 100°C erhitzt
PCI	50 ml Phenol pH 8, 48 ml Chloroform, 2 ml Isopropanol

### 2.2.2 Isolation von genomischer DNA aus *T. maritima*

Genomische DNA wurde aus einer gefriergetrockneten *T. maritima* Kultur gewonnen. Nach Resuspension des Zellpellets in 700 µl TNE und 100 µl Proteinase K Lösung wurden die Zellen durch Zugabe von 1 % SDS und 1 % Sarkosyl aufgelöst. Freie RNA wurde durch 15 minütige Inkubation mit 10 µl RNase A Lösung bei Raumtemperatur abgebaut. Um einen vollständigen Zellaufschluss zu erzielen, wurde der Lösung 50 µl Proteinase K Lösung zugesetzt und für weitere 60 min bei 55°C inkubiert. Genomische DNA wurde durch Phenol-Chloroform-Präzipitation extrahiert. Dazu wurde 1 Volumen PCI zum Ansatz gegeben, vorsichtig gemischt und für 30 min geschüttelt. Nach Zentrifugation (5 min, 15000 x g, RT) wurde die DNA-haltige, wässrige Phase abgenommen, nochmals mit 1 Volumen PCI versetzt und wie beschrieben geschüttelt und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde durch Zugabe von 1 Volumen Chloroform und Zentrifugation (15 min, 15000 x g, RT) erneut extrahiert und die DNA durch Zugabe von 800 µl Isopropanol zur wässrigen Phase gefällt. Genomische DNA wurde durch Zentrifugation (5 min, 20000 x g, RT) pelletiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und nach Trocknung in 25 µl TE aufgenommen.

### 2.2.3 Klonierung des Zielplasmids

Zu Beginn der Klonierungsarbeiten wurde der Zielvektor pET-28a(+) (Novagen, Madison, USA) mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NotI* gespalten. Restriktionsenzyme und kleine DNA-Fragmente wurden anschließend mittels eines 1%igen Agarosegels elektrophoretisch vom geschnittenen Vektor getrennt. Die dem geschnittenen Vektor entsprechende Bande wurde im UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe eines MinElute Gel Extraction Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Um eine Religation des Vektors ohne DNA-Integrat zu verhindern, wurde das linearisierte Produkt mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und schließlich mittels des MinElute Reaction Purification Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt und in 20 µl Puffer aufgenommen (10 mM Tris/HCl, pH 8.5). Tabelle 2.4 zeigt die genauen Bedingungen der Reaktionen zur Vorbereitung des Expressionsvektors. Alle Enzyme und Puffer für die Klonierung des *topA*-Gens wurden von Roche (Mannheim) bezogen.

## 2 Material und Methoden

---

**Tab. 2.4:** Vorbereitung des Expressionsvektors

<b>Restriktionsspaltung</b>	<b>Dephosphorylierung</b>
16 µl pET-28a(+), 50 ng/µl 2 µl 10 x Sure/Cut Puffer H 1 µl <i>Nco</i> I 1 µl <i>Not</i> I	10 µl pET-28a(+), linearisiert 2 µl SAP 2 µl 10 x SAP Puffer 6 µl H <sub>2</sub> O
Inkubation: 1.5 h, 37°C	Inkubation: 30 min, 37°C

Das *topA*-Gen wurde von genomischer DNA aus *T. maritima* mittels PCR amplifiziert. Für die PCR-Reaktion wurden folgende Primer (TIB Molbiol, Berlin) verwendet:

5'-TACCATGGCTAAGAAAGTGAAGAAATATAT-3' (*topA\_1*)

5'-ACTTGCGGCCGCTTAAGAGCCTTTTTTACCCTTTC-3' (*topA\_2*).

Die Restriktionsschnittstellen sind durch Unterstreichung gekennzeichnet. Stammlösungen der Primer (10 pmol/µl in 10 mM Tris/HCl, pH 8.5) wurden bei -20°C gelagert. Zur Amplifikation wurde eine modifizierte Version der thermostabilen *Pfu*-DNA-Polymerase verwendet. Das Enzym Herculase, ein optimierter Reaktionspuffer sowie ein dNTP-Mix wurden von Stratagen (La Jolla, USA) bezogen. Tabelle 2.5 zeigt die genaue Zusammensetzung der PCR-Ansätze sowie die verwendeten PCR-Bedingungen. Zur Kontrolle der Reaktion wurde anschließend ein Teil des PCR-Ansatzes mittels Gelelektrophorese analysiert. Die PCR Produkte wurde mit Hilfe eines MinElute PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) gereinigt und mit den Restriktionsenzymen *Nco*I und *Not*I gespalten. Um Enzyme und kurze, abgespaltene DNA-Fragmente zu entfernen, wurde das Produkt mittels des MinElute Reaction Purification Kits (Qiagen, Hilden) gereinigt und in 10 µl Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8.5) aufgenommen. Das gereinigte *topA*-DNA-Fragment wurde mit dem vorbereiteten pET28a(+)-Vektor ligiert. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist Tabelle 2.5 zu entnehmen. Der Ligationsansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Agarosegele zur Dokumentation der einzelnen Schritte der Klonierung wurden unter UV-Licht photographiert. Das erhaltene Plasmid wird im folgenden mit pET28a-*topA* bezeichnet.

**Tab. 2.5:** Amplifikation des *topA*-Gens und Ligation des *topA*-Plasmids

PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen	Ligationsansatz
5 µl genomische DNA	4 min 95 °C	0.5 µl pET-28a(+)
1 µl Herculase	1 min 94°C	2 µl <i>topA</i> -PCR-Produkt
5 µl 10 x Herculase-Puffer	1 min 40°C	1 µl T4-Ligase
1 µl 25 nM NTP-Mix	3 min 72°C	1 µl 5 x Ligase-Puffer
1 µl Primer <i>topA</i> _1	10 min 72°C	12.5 µl H <sub>2</sub> O
1 µl Primer <i>topA</i> _2		
36 µl H <sub>2</sub> O		
	x 25	Inkubation: 1h, RT

### 2.2.4 Hitzeschock-Transformation

Zur Amplifikation des erhaltenen Plasmids oder der Expression von TmTop I wurde pET28a-*topA* mittels Hitzeschock in die kompetenten *E. coli* Stämme DH5α oder BL21 (DE3) transformiert. 50 µl Zellsuspension wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Plasmid für 30 min inkubiert. Nach 45 sec Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 450 µl SOC Medium wurden die Zellen für 1 h bei 37°C inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Platten mit 50 µg Kanamycin pro ml Medium (LB/Kana50) ausgestrichen oder direkt für die Proteinexpression eingesetzt.

### 2.2.5 Plasmidpräparation

*E. coli* DH5α Zellen wurden mit pET28a-*topA* oder pUC18 (Roche, Mannheim) transformiert. Für die Präparation von kleinen Plasmidmengen wurden Klone von LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum für 6 h oder 16 h bei 37°C unter ständigem Schütteln in 2 ml LB-Flüssigkulturen angezogen. Die Plasmide wurden mit Hilfe des MiniPrep Kits (Qiagen, Hilden) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Für die Präparation von großen Plasmidmengen wurden frische Transformationsansätze direkt zu 200 ml LB Flüssigmedium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Plasmid-DNA wurde mit dem MidiPrep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.2.6 Restriktionsanalyse und Sequenzierung des *topA*-Plasmids

Um geeignete Klone mit korrekten pET28a-*topA*-Plasmiden zu identifizieren, wurde zunächst eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Dazu wurden pET28a-*topA* Plasmide von zehn unterschiedlichen Klonen isoliert, mit den Restriktionsenzymen *NcoI* und *NotI* inkubiert (Tab. 2.6), mittels Gelelektrophorese in 1.2 %igen Agarosegelen analysiert und unter UV-Licht photographiert.

**Tab. 2.6:** Restriktionsanalyse des *topA*-Plasmids

---

**Restriktionsspaltung**

---

5 µl pET28a-*topA* (36 ng/µl)  
2 µl 10 x Sure/Cut Puffer H  
0.3 µl *NcoI*  
0.3 µl *NotI*  
12.4 µl H<sub>2</sub>O

Inkubation: 1 h, 37°C

Plasmide, die im Experiment die erwarteten Fragmentgrößen zeigten, wurden mit Hilfe des MinElute Reaction Purification Kits (Qiagen, Hilden) auf 200 ng/µl konzentriert und durch die Zentrale Analytik der BayerHealthCare AG sequenziert. Für die Sequenzierreaktion wurden fünf Primer (TIB Molbiol, Berlin) verwendet (Tab. 2.7).

**Tab. 2.7:** Primer zur Sequenzierung des *topA*-Plasmids

---

<b>Primer</b>	<b>Sequenz</b>
topA_3	5'-TACCATGGCTAAGAAGAAATATAT-3'
topA_4	5'-ACTTGCGGCCGCTTAAGAGCCTTTTTTACCCTTTC-3'
topA_5	5'-ACTTGCGGCCGCTTAATCAACCACAATTCTGTCGT-3'
T7_pro	5'-TAATACGACTCACTATAG GG-3'
T7_ter	5'-ATGCTA GTTATTGCTCAGCG-3'

---

### 2.3 Proteinexpression und Reinigung

#### 2.3.1 Allgemeines

Topoisomerase I aus *T. maritima* (TmTop I) wurde heterolog in *E. coli* exprimiert und bis zur Homogenität gereinigt (Details siehe unten). Humane neutrophile Elastase (HNE) wurde über die Firma Serva (Heidelberg) in lyophilisierter Form bezogen (Produktnummer 20927.01). Das Lyophilisat wurde in 10 mM HEPES/NaOH, pH 6.5 gelöst, um eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 10 mg/ml zu erhalten. Die Lösung wurde direkt für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

#### Medien und Puffer

Puffer A	50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl
Puffer B	50 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 7.5, hergestellt mit 1M $\text{KH}_2\text{PO}_4$ und 1M $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 100 mM NaCl
Puffer C	20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl
LB/Kana50	LB-Flüssigmedium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin

## 2 Material und Methoden

---

### 2.3.2 Proteinexpression

TmTop I wurde in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Eine 1000 ml Vorkultur LB/Kana50-Flüssigmedium wurde mit einem Transformationsansatz beimpft und in zwei 1000 ml Erlenmeyerkolben über Nacht bei 37°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Die Hauptkultur wurde in Einwegkunststoff-Bioreaktorbeuteln (WaveBag) mit einem Fassungsvermögen von 25 l Medium mit Hilfe eines BioWave 50 Bioreaktors (Wave Biotech, Bridgewater, USA) fermentiert. Die Hauptkultur mit einem Gesamtvolumen von 25 l wurde mit der Vorkultur 1:25 angeimpft und bei 37°C inkubiert. Die Wippgeschwindigkeit des Bioreaktors betrug 30 rpm bei einem Neigungswinkel von 10° und einer Belüftungsrate von 0.5 l/min. Nachdem die Bakterienkultur eine OD<sub>600</sub> von 0.75 erreicht hatte, wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 3 h Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation (30 min, 4000 x g, 4°C) geerntet und bei -80 C° gelagert.

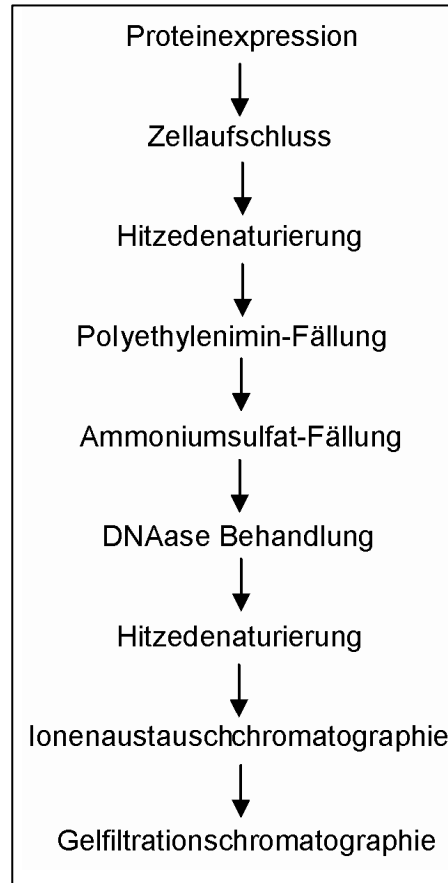
### 2.3.3 Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 1.5 ml/g Puffer A mit 0.5 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 40 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mittels Ultraschallbehandlung vollständig aufgeschlossen. Um einen möglichst schonenden Aufschluss zu erzielen, wurde die gesamte Ultraschallbehandlung auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden 7 x 20 sec mit Ultraschall behandelt (Branson, Danbury, USA), zwischen den Zyklen wurde das Rohlysat jeweils für 30 sec auf Eis gekühlt. Das Lysat wurde mit Puffer A auf ein Volumen von 80 ml aufgefüllt. Zelltrümmer wurden anschließend mittels Zentrifugation entfernt (60 min, 50000 x g, 4°C).



### 2.3.4 Proteinreinigung

Eine Übersicht über den Verlauf der TmTop I Reinigung gibt Abbildung 2.1.



**Abb. 2.1:** Verlauf der Reinigung der TmTop I

Im ersten Reinigungsschritt wurden die meisten *E. coli* Proteine des Zelllysates durch Inkubation für 20 min bei 75°C präzipitiert. TmTop I ist bei dieser Temperatur stabil und bleibt in Lösung. Die präzipitierten Proteine wurden mittels Zentrifugation abgetrennt (40 min, 50.000 x g, 4°C). Um *E. coli*-DNA effektiv aus der Lösung zu entfernen, wurde unter ständigem Rühren bei 4°C schrittweise Polyethylenimin (PEI) bis zu einer Endkonzentration von 0.5 % zugesetzt. Die Probe wurde 1 h bei 4°C gerührt und das PEI-Präzipitat durch Zentrifugation entfernt (40 min, 50.000 x g, 4°C). Dem Überstand wurde Ammoniumsulfat bis zu einer 70 %igen Sättigung der Lösung zugesetzt und unter Rühren über Nacht bei 4°C inkubiert. Gefällte Proteine wurden durch Zentrifugation pelletiert und in 20 ml Puffer B gelöst. Um verbliebene DNA zu entfernen, wurde der Lösung 80 µg/ml DNAse I und 5 mM MgCl<sub>2</sub> zugesetzt und 2 h bei

## 2 Material und Methoden

---

Raumtemperatur inkubiert. Um die DNase-Aktivität vollständig aus der Lösung zu entfernen, wurde ein zweiter Hitzedenaturierungsschritt durchgeführt (25 min, 75°C). Nach Zentrifugation (40 min, 50000 x g, 4°C) und Filtration des Überstandes (Porengröße 0.22 µm, Vivascience, Hannover) wurde eine Kationenaustauschchromatographie durchgeführt. Die verwendete 5 ml HighTrap SP FF Säule (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurde mit 10 Säulenvolumina Puffer B äquilibriert und die Probe anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Das Protein wurde mittels eines linearen Gradienten von 0.1 M NaCl bis 1 M NaCl in Puffer B eluiert. Der Proteingehalt der Fraktionen wurde durch SDS-Gelelektrophorese überprüft und Fraktionen vereinigt, die TmTop I enthielten. Die Proteinlösung wurde mit Ultrafiltrationseinheiten (Ausschlussgröße 30 kDa, Vivascience, Hannover) auf ein Volumen von 10 ml konzentriert und erneut mittels Vakuumfiltrationseinheiten (Porengröße 0.22 µm, Vivascience, Hannover) filtriert. Eine Gelfiltrationssäule mit einem Bettvolumen von 320 ml (Sx200 26/60; Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) wurde mit Puffer C äquilibriert und die Proteinprobe bei einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Chromatographie wurde bei einer Flussrate von 2.5 ml/ml in Puffer C durchgeführt. Elutionsfraktionen wurden durch SDS-Gelelektrophorese analysiert und Proben vereinigt, die TmTop I enthielten. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration wurde TmTop I durch Ultrafiltration auf 7 mg/ml konzentriert, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

### 2.4. Proteinanalytik

#### 2.4.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde mit Hilfe des Criterion-System und vorgefertigter 10% Bis-Tris-Gele (BioRad, München) durchgeführt. Falls erforderlich wurden zu analysierende Proteinlösungen mit Wasser verdünnt, anschließend mit 5 x SDS-Auftragspuffer (BioRad, München) versetzt und bei 95°C für 5 min inkubiert. Die Elektrophorese wurde mit MES-Puffer (BioRad, München) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie-Reagenz (Rotiphorese Blau R; Roth, Karlsruhe) sichtbar gemacht. Als Größenmarker wurde ein Molekulargewichtsstandard von BioRad verwendet, der folgende Proteine enthielt: Myosin 200 kDa,  $\beta$ -Galaktosidase 116.25 kDa, Phosphorylase b 97.4 kDa, Serum-Albumin 66.2 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Carboanhydrase 31 kDa, Trypsininhibitor 21.5 kDa, Lysozym 14.4 kDa, Aprotinin 6.5 kDa.

#### 2.4.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden mit unterschiedlichen Verfahren bestimmt. Die photometrische Bestimmung des Proteingehaltes bei einer Wellenlänge von 280 nm wurde mit Hilfe des theoretischen Extinktionskoeffizienten durchgeführt. Zusätzlich wurde das Verfahren nach Bradford verwendet (Bradford Proteinassay; BioRad, München). Als Proteinstandard wurde BSA genutzt.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.4.3 Massenspektrometrie

Gereinigte Proteine wurden mit Hilfe von MALDI-TOF-Massenspektrometrie charakterisiert (MALDI, engl. *matrix assisted laser desorption ionization*; TOF, engl. *time of flight*). Proteinproben mit einer Konzentration von 10 pmol/ $\mu$ l wurden gegen 0.1% TFA dialysiert. 5  $\mu$ l des Dialysats wurde mit 15  $\mu$ l 0.1% TFA und 30  $\mu$ l einer mit Sinapinsäure gesättigten Acetonitril-Wasser-Lösung 1:1 (v/v) gemischt. Markierungen auf dem Probenhalter wurden mit einer Ethanol-Dünnschicht (0.5  $\mu$ l gesättigte Lösung von Sinapinsäure in Ethanol) benetzt und nach dem Trocknen wurden jeweils 0.5  $\mu$ l Probe aufgetragen. Durch Bestrahlung der vorbereiteten Proteinprobe mit Laserlicht einer Wellenlänge im Bereich des Absorptionsmaximums der Matrixsubstanz (337 nm) wurde die Probe in die Gasphase überführt. Massenspektren wurden bei einer Beschleunigungsspannung von 19 kV aufgenommen. Das Masse/Ladungsverhältnis (m/z) wurde anschließend mit Hilfe eines Flugzeitanalysators gemessen. Um das Signal des Proteins zu verstärken, wurden Ionen mit einer Masse unter 1000 Da abgelenkt. Als Standard für die externe Kalibrierung wurde BSA verwendet.

Zur Identifikation von Proteinen wurde *peptide-map*-Massenspektrometrie verwendet. Die Untersuchungen wurden vom Labor für Proteinanalytik, BayerHealthCare AG, Abteilung Enabling Technologies 3 durchgeführt. Die in den Proben vorhandenen Proteine wurden durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, Proteinbanden aus den SDS-Gelen ausgeschnitten und proteolytisch gespalten. Die entstandenen Peptide wurden massenspektroskopisch untersucht.

### 2.4.4 DNA-Relaxationstest der TmTop I und der EcTop I

Die Aktivität der gereinigten TmTop I wurde mit Hilfe eines DNA-Relaxationstests überprüft. Mit der gereinigten TmTop I-Probe wurde eine Verdünnungsreihe in 50 mM Tris/HCl, pH 8, 1 mM DTT, 100  $\mu$ g/ml BSA hergestellt. Als Substrat wurde das negativ superspiralisierte Plasmid pUC18 aus *E. coli* verwendet. TmTop I-Proben unterschiedlicher Konzentration wurden mit pUC18-DNA in Reaktionspuffer (50 mM Tris pH 8, 250  $\mu$ M DTT, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 180 mM NaCl) für 30 min bei 75°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5  $\mu$ l Stopplösung (50 mM EDTA, 2.5 % SDS, 25 % Glycerin, 0.2 % Bromphenolblau) beendet. 10  $\mu$ l des Ansatzes wurden abgenommen und mit Hilfe eines 1%igen Agarosegels analysiert. Gele wurden mit

0.5 x Tris-Borat-EDTA-Puffer (Sigma, Deisenhofen) hergestellt. Die genauen Bedingungen der Reaktion und der elektrophoretischen Analyse sind Tabelle 2.8 zu entnehmen.

**Tab. 2.8:** DNA-Relaxationstest der TmTop I

<b>Reaktionsbedingungen</b>	<b>Nachweis der Reaktionsprodukte</b>
9 µl Reaktionspuffer	1 %iges Agarosegel
6 µl pUC18 (30 ng/µl)	10 µl Reaktionsansatz
5 µl Topoisomerase-Lösung	
Inkubation: 30 min, 75°C (TmTop I) oder 37°C (EcTop I)	Elektrophorese: 1.5 h, 100 V

Nach Auftrennung der DNA-Topoisomere wurde das Gel mit Hilfe einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) für 30 min gefärbt. Anschließend wurde das Gel für 30 min in H<sub>2</sub>O entfärbt und unter UV-Licht photographiert. Um die erhaltenen Ergebnisse für die TmTop I mit einer anderen Topoisomerase vergleichen zu können, wurde ein ähnliches Experiment mit EcTop I bei einer Temperatur von 37°C durchgeführt. Das für dieses Experiment verwendete EcTop I-Enzym wurde freundlicherweise von Dr. Axel Harrenga (Enabling Technologies 3, BayerHealthCare AG) zur Verfügung gestellt.

### 2.5 Proteinkristallisation

#### 2.5.1 Kristallisation von Apo-Proteinen und Ko-Kristallisation mit Inhibitoren

Die Kristallisationsversuche wurden nach der Dampfdiffusionsmethode mit hängendem und sitzendem Tropfen durchgeführt. Es wurden VDX-Platten und silikonisierte Deckgläschen oder Cryshem Schalen mit Kristallisationsbrücken verwendet (Hampton Research, Laguna Niguel, USA).

Für Kristallisationsexperimente mit dem HNE-Apo-Enzym wurde das Protein-Lyophilisat in 10 mM Hepes/NaOH, pH 6.5 gelöst, um eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml zu erhalten. Die Proteinlösung wurde danach ständig auf Eis gekühlt. Vor Beginn der HNE-Ko-Kristallisationsexperimente wurde zunächst eine Lösung des Inhibitors WO24700 einer Konzentration von 250 mM in DMSO hergestellt. Diese Lösung wurde zur Proteinlösung (10 mg/ml HNE in Hepes/NaOH pH 6.5) gegeben, um eine Endkonzentration von 1 mM WO24700 und 7 % DMSO zu erhalten. Das Gemisch wurde vor der Kristallisation 30 min auf Eis inkubiert, um eine Bindung des Inhibitormoleküls an das Enzym zu ermöglichen. Zur Kristallisation der TmTop I wurde das gereinigte Protein auf Eis aufgetaut, zentrifugiert (2 min, 10000 x g, RT) und direkt für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

Kristallisationstropfen wurden manuell gemischt und bestanden aus Proteinlösung, Reservoirlösung und gegebenenfalls Additivlösungen. Die Kristallisationsansätze wurden bei 18°C oder 4°C inkubiert. Ergebnisse der Kristallisationsexperimente wurden in regelmäßigen Abständen unter einem Stereomikroskop untersucht, protokolliert und photographisch dokumentiert. Initiale Kristallisationsexperimente nach dem Schema der unvollständigen faktoriellen Suche (engl. *sparse matrix screen*; Jancarik und Kim, 1991) wurden mit kommerziell erhältlichen Lösungen (Kristallisations-Screens) durchgeführt (Tab. 2.9). Das Kristallisationsverhalten der Proteine konnte so bei insgesamt 578 unterschiedlichen initialen Bedingungen getestet werden. Wurde eine Bedingung identifiziert, bei der kristalline Objekte beobachtet werden konnten, erfolgte eine Optimierung durch systematische Variation der Kristallisationsparameter.

**Tab. 2.9:** Übersicht über die verwendeten Kristallisations-Screens

Screen	Hersteller
Crystal Screen I + II	Hampton Research, La Niguella, USA
PEG/Ion Screen I + II	
Quik Screen	
Grid Screen Ammonium Sulfate	
Grid Screen MPD	
Grid Screen PEG 6000	
Grid Screen PEG/LiCl	
Grid Screen NaCl	
JBScreen Classic 1 - 10	Jena Bioscience, Jena
Wizard I + II	Emerald Biostructures, Bainbridge Island, USA

Nach der Optimierung der Kristallisationsbedingungen und Herstellung von geeigneten Kristallen wurden diese falls notwendig in Lösungen mit Cryoprotektant überführt und für 5 - 10 sec inkubiert. Da TmTop I Kristalle ausschließlich unter Bedingungen hergestellt werden konnten, die einen hohen Anteil O-(2-Aminopropyl)-O'-(2-methoxyethyl)polypropylene glycol 500 (Jeffamine M-600) enthielten, war hier die Zugabe von Cryoprotektant nicht erforderlich. Für Kristalle der HNE konnte Glycerin als geeignetes Cryoprotektant ermittelt werden. Die Kristalle wurden bis zur Diffraktionsmessung in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.5.2 Einbringen von Inhibitoren in bestehende Kristalle

Zur Herstellung von Protein-Inhibitor-Komplexen innerhalb bereits bestehender Kristalle wurden primitiv-orthorhombische Kristalle der humanen neutrophilen Elastase in Stabilisierungslösungen mit Inhibitormolekülen inkubiert. Dieses Verfahren wird als *soaking* bezeichnet. Die genaue Bedingung der Ansätze ist in Tabelle 2.10 dargestellt. Die Kristalle wurden nach einer kurzen Inkubation in Cryoprotektionslösung bis zur Diffraktionsmessung in flüssigen Stickstoff gelagert.

**Tab. 2.10:** Bedingung zur Herstellung des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes

<b>Stabilisierungslösung</b>	<b>Inkubationszeit</b>
25 % PEG 8000 0.1 M Na-Kakodylat pH 6.5 14 mM TFA-Val-Tyr-Val-OH 6 % DMSO	5 min



### 2.6 Diffraktionsexperimente

#### 2.6.1 Allgemeines

Datensätze der TmTop I wurden an den Synchrotronen Swiss Light Source (SLS, Villingen) und European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble) aufgenommen. Datensätze des HNE-Apo-Enzyms und des HNE-WO24700 Komplexes wurden am DORIS Speicherring des DESY (Hamburg) an den Messplätzen der EMBL-Außenstation gemessen. Die Kristalle des HNE-Komplexes mit dem Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH wurde an der hauseigenen Drehanode mit Cu-K $\alpha$ -Strahlung vermessen.

Um das Diffraktionsvermögen der Kristalle in mehreren Raumrichtungen zu charakterisieren, wurden zunächst zwei Rotationsaufnahmen gemacht, die einen Abstand von 90° zueinander aufwiesen. Zur Festlegung einer optimalen Messstrategie wurden die Optionen *strategy* und *testgen* des Programms MOSFLM (CCP4, 1994) verwendet. Der Kristall-Detektor-Abstand und der Rotationswinkel pro Aufnahme wurden den Vorschlägen der Software entsprechend angepasst. Alle Diffraktionsexperimente wurden bei einer Temperatur von 100 K mit Hilfe von flüssigem Stickstoff durchgeführt.

#### 2.6.2 Datensätze der TmTop I

Ein erster Datensatz eines TmTop I-Kristalls der triklinen Raumgruppe wurde am PX1-Messplatz des SLS in Villingen aufgenommen. Dieser Messplatz war mit einem horizontalen Si(111)-Monochromator, einem vertikalen, dynamischen Spiegel und einem MAR225-CCD-Detektor (MAR Research, Norderstedt) ausgestattet. Die Belichtungszeit betrug 1 sec pro Aufnahme. Hochaufgelöste Datensätze von Kristallen der triklinen und monoklinen Raumgruppe der TmTop I wurden am Messplatz ID29 des ESRF in Grenoble aufgenommen. Dieser Messplatz war neben einem horizontalen Si(111)-Monochromator und einem vertikalen, dynamischen Spiegel mit einem ADSC-Q210-2D-CCD-Detektor (ADSC, Poway, USA) bestückt. Die Belichtungszeit betrug 10 sec pro Aufnahme. Die genauen Parameter der einzelnen Messungen sind Tabelle 2.11 zu entnehmen. Um den anomalen Streubeitrag von Zink nutzen zu können, wurde

## 2 Material und Methoden

---

ein Datensatz der monoklinen Kristallform bei einer Wellenlänge von 1.2815 Å aufgenommen. Zur genauen Bestimmung der Wellenlänge dieses anomalen Datensatzes wurde ein Röntgenfluoreszenzspektrum angefertigt und mit Hilfe des Programms CHOOCH (Evans und Pettifer, 1996) ausgewertet.

**Tab. 2.11:** Messparameter für Datensätze der TmTop I

Raumgruppe	P1	P1	P2 <sub>1</sub>
Messplatz	PX1 (SLS)	ID29 (ESRF)	ID29 (ESRF)
Wellenlänge (Å)	0.9190	0.9756	1.2815
Kristall-Detektor			
Abstand (mm)	160	155	135
Rotation / Bild (°)	1	0.5	0.5
Anzahl der Bilder	180	559	400
Gesamtrotation (°)	180	279.5	200

### 2.6.3 Datensatz des HNE-Apo-Enzyms

Kristalle des HNE-Apo-Enzyms wurden an den institutseigenen Drehanoden mit Cu-K $\alpha$ -Strahlung charakterisiert. Ein hochaufgelöster Datensatz der tetragonalen Kristallform wurde unter Verwendung von Synchrotronstrahlung aufgenommen. Der *bending-magnet* Messplatz X31 (DESY) war mit einem doppelten Si(111)-Monochromator, einem ringförmigen Spiegel und einem MAR300 Flächendetektor (MAR Research, Norderstedt) ausgestattet. Die Belichtungszeit betrug 10 min pro Aufnahme. Die Messparameter des Datensatzes sind Tabelle 2.12 zu entnehmen.

**Tab. 2.12:** Messparameter des Datensatzes des HNE-Apo-Enzyms

Raumgruppe	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Messplatz	X31 (DESY)
Wellenlänge (Å)	1.1
Kristall-Detektor	
Abstand (mm)	260
Rotation / Bild (°)	1.08
Anzahl der Bilder	165
Gesamtrotation (°)	178.2

### 2.6.4 Datensatz des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes

Kristalle des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes wurden an der institutseigenen Nonius-Drehanode mit Cu-K- $\alpha$ -Strahlung aufgenommen. Besondere Ausstattungsmerkmale dieses Gerätes sind Tabelle 2.1 zu entnehmen. Die Belichtungszeit betrug 30 min pro Aufnahme. Die Messparameter des Datensatzes sind in Tabelle 2.13 aufgeführt.

**Tab. 2.13:** Messparameter des Datensatzes des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes

Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Messplatz	Nonius (Institut für Biochemie)
Wellenlänge (Å)	1.54178
Kristall-Detektor	
Abstand (mm)	200
Rotation / Bild (°)	1
Anzahl der Bilder	163
Gesamtrotation (°)	163

### 2.6.5 Datensatz des HNE-WO24700-Komplexes

Ein hochaufgelöster Datensatz des HNE-WO24700-Komplexes wurde unter Verwendung von Synchrotronstrahlung am *bending-magnet* Messplatz X31 (DESY, Hamburg) aufgenommen. Die Belichtungszeit betrug 10 min pro Aufnahme. Die Messparameter des Datensatzes sind Tabelle 2.14 zu entnehmen.

**Tab. 2.14:** Messparameter des Datensatzes des HNE-WO24700-Komplexes

Raumgruppe	P6 <sub>3</sub>
Messplatz	X31 (DESY)
Wellenlänge (Å)	1.1
Kristall-Detektor	
Abstand (mm)	260
Rotation / Bild (°)	1.08
Anzahl der Bilder	165
Gesamtrotation (°)	178.2

### 2.7 Datenreduktion

Diffractionsbilder wurden mit den Programmen DENZO und SCALEPACK (Otwinowski und Minor, 1997) oder MOSFLM und SCALA (CCP4, 1994) indiziert, integriert und skaliert. Der Datensatz der monoklinen Kristallform der TmTop I wurde in SCALA mit der Option *separate anomalous pairs* ausgewertet. Die Strukturfaktoramplituden wurden bei allen Datensätzen mit TRUNCATE (CCP4, 1994) aus den gemessenen Intensitäten berechnet. Die freien Reflexe für die Kreuzvalidierung bei der Strukturverfeinerung wurden mit UNIQIFY (CCP4, 1994) bestimmt, die Packungsdichte mit MATTHEWS\_COEFF (CCP4, 1994). Selbstrotationsfunktionen und native Patterson-Karten wurden mit dem Programmen AmoRE, MolREP und PATTERSON (CCP4, 1994) berechnet.

### 2.8 Strukturlösung durch Molekularen Ersatz

#### 2.8.1 Strukturlösung der TmTop I

Als Suchmodell für den Molekularen Ersatz der TmTop I in der triklinen Kristallform wurde die Struktur der *E. coli* Topoisomerase I (Lima et al., 1994; 1ECL) verwendet. Vor Beginn der Rechnungen wurden alle Wassermoleküle aus der Datei entfernt. Die Rechnungen zum Molekularen Ersatz wurde mit dem Programm AmoRE (CCP4, 1994) in einem Auflösungsbereich von 3 Å - 15 Å durchgeführt. An die Rotations- und Translationssuche schloss sich eine Starre-Körper-Verfeinerung gegen normalisierte Strukturfaktoramplituden an.

Die Struktur der monoklinen Kristallform der TmTop I wurde unter Verwendung der vollständig verfeinerten Proteinstruktur aus der triklinen Kristallform der TmTop I als Suchmodell gelöst.

#### 2.8.2 Strukturlösung des HNE-Apo-Enzyms und der HNE-Inhibitorkomplexe

Die Strukturen des HNE-Apo-Enzyms und der Komplexe der HNE mit unterschiedlichen Inhibitoren wurden durch Molekularen Ersatz mit dem Programm AmoRE (CCP4, 1994) gelöst. Als Suchmodell wurde in allen Fällen die Struktur des HNE-Komplexes mit MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-CH<sub>2</sub>Cl (Navia et al., 1989; 1HNE) verwendet. Vor Beginn der Rechnungen wurden alle Inhibitor- und Wassermoleküle aus der Datei entfernt. Rechnungen wurden in einem Auflösungsbereich von 3 Å - 15 Å durchgeführt. An die Rotations- und Translationssuche schloss sich eine Starre-Körper-Verfeinerung gegen normalisierte Strukturfaktoramplituden an.

### 2.9 Modellbau und Verfeinerung

Ein erstes Modell der TmTop I wurde mit Hilfe von Methoden des Molekularen Ersatzes erhalten. Dieses Modell basierte auf einem Datensatz bis zu einer Auflösung von 2.5 Å, gemessen am SLS (Villingen). Obwohl die erhaltene Lösung diffuse Elektronendichten für die sehr viele Bereiche der Proteinkette des Modells aufwies, ergab sich eine physikalisch mögliche Kristallpackung. Mit Hilfe des Programms O (Jones et al., 1991) wurden zunächst Teile des Modells entfernt, die nicht eindeutig durch Elektronendichte definiert waren. Aminosäuren mit schlecht definierten Seitenketten wurden in Alanin umgewandelt. Rechnungen zur Mittelung von Elektronendichten für unterschiedliche Moleküle der asymmetrischen Einheit wurden mit dem Programm DM (Cowtan und Zhang, 1999) durchgeführt.

Ausgehend von diesem Modell konnte die Struktur der TmTop I mit Hilfe eines hochaufgelösten Datensatzes der triklinen Kristallform vollständig gelöst werden. Der verwendete Datensatz wurde am ESRF (Grenoble) gemessen und schloss in der höchsten Schale Reflexe bis zu einer Auflösung von 1.7 Å mit ein. Das bestehende, partielle Strukturmodell der TmTop I konnte unter Verwendung dieses Datensatzes mit Hilfe des Programms ARP/wARP (Perrakis et al., 2001) im Modus *automated model building starting from existing model* vervollständigt werden.

Die durch Molekularen Ersatz erzeugten Lösungen für die Strukturen des HNE-Apo-Enzyms und der HNE-Inhibitorkomplexe wiesen, wie aufgrund der Identität des Proteins zu erwarten, sehr gute Elektronendichten für die meisten Bereiche des Proteins auf.

Zur Verfeinerung aller Modelle wurden iterative Zyklen von manueller Anpassung des Strukturmodells mit dem Programm O (Jones, 1991) und molekularen Verfeinerungsrechnungen mit REFMAC (CCP4, 1994) verwendet. Zu Beginn der Verfeinerung wurde, falls notwendig, nicht-kristallographische Symmetrie durch NCS-Operatoren (*restraints*) berücksichtigt. Während der letzten Phasen des Verfeinerungsprozesses wurden Inhibitormoleküle manuell und Wassermoleküle mit Hilfe von ARP/wARP (Perrakis et al., 1999) eingefügt. Die dreidimensionalen Strukturen der Inhibitoren wurden mit Hilfe von REFMAC generiert und unter Verwendung von O in die Modelle eingefügt. Elektronendichtekarten, die für den Einbau der Inhibitoren genutzt wurden, basierten auf Phasen der verfeinerten Proteinstrukturen. Um Dislokationen einzelner Moleküle und Anisotropie der Daten zu

berücksichtigen, wurden falls, erforderlich Translations-, Librations-, und Schraubenachsen-Rotations-Tensoren (TLS; Winn et al., 2001) während des letzten Verfeinerungsschrittes definiert. Unter Verwendung dieser Tensoren wurde die finale Verfeinerung der Strukturen in REFMAC durchgeführt.

### 2.10 Validierung und Darstellung der Modelle

Während der Verfeinerung der Strukturen wurden die Modelle durch Validierungsroutinen der verwendeten Programme auf ihre stereochemische Validität überprüft. Ramachandran-Plots wurden mit PROCHECK (Laskowski et al., 1993) angefertigt. Die Sekundärelemente der Strukturen wurden mit DSSP (Kabsch und Sander, 1983) bestimmt.

Abbildungen wurden mit Hilfe von Pymol (DeLano, 2002), Topdraw (Bond, 2003) und MDL ISIS/DRAW (MDL, San Leandro, USA) erstellt. Zur Berechnung von elektrostatischen Oberflächenpotentialen wurde das Programm APBS (Baker et al., 2001) verwendet.



### 3 Ergebnisse und Diskussion

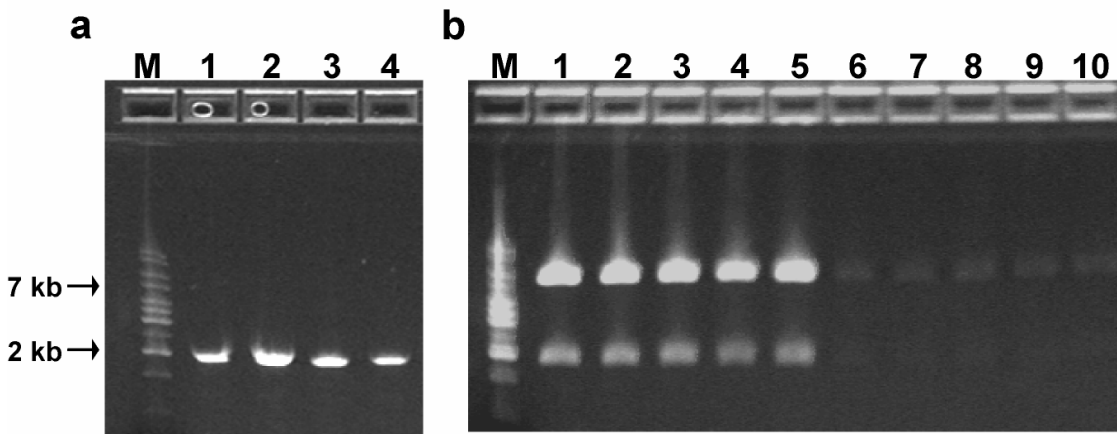
#### 3.1 Topoisomerase I aus *T. maritima*

##### 3.1.1 Klonierung des *topA*-Gens

Zur Herstellung des Expressionsvektors für TmTop I wurde das Gen *topA* von genomischer DNA aus *T. maritima* kloniert. Genomische DNA des Stammes MSB8 (Huber et al., 1986) wurde mittels einer für thermophile Bakterien geeigneten Methode isoliert (Details siehe Material und Methoden). Das *topA*-Gen wurde durch PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NcoI* und *NotI*, um die einfache Klonierung in einen geeigneten Expressionsvektor zu ermöglichen. Die Analyse der PCR-Produkte durch Gelelektrophorese zeigte DNA-Fragmente der erwarteten Größe von 1.9 kb (Abb. 3.1a). Das PCR-Produkt wurde über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *NcoI* und *NotI* in den vorbereiteten Expressionsvektor pET28a(+) kloniert. Nach Transformation des *E. coli* Stammes DH5 $\alpha$  wurde eine Suspension transformierter Bakterien auf LB-Festmedium plattiert und über Nacht inkubiert. Zur Identifikation von Klonen mit *topA*-Insertion wurden 10 Kolonien vom LB-Festmedium für 6 h oder 16 h in LB-Flüssigmedium inkubiert, die Plasmid-DNA isoliert und eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Wie in Abbildung 3.1b zu erkennen, wiesen alle Ansätze DNA-Fragmente der erwarteten Größe (1.9 kb und 6.9 kb) auf.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---



**Abb. 3.1:** Klonierung des *topA*-Gens aus *T. maritima*. **(a)** Amplifikation des *topA*-Gens durch PCR. Die Spuren 1 - 4 zeigen das PCR-Produkt in unterschiedlichen Konzentrationen (Verdünnungsfaktoren: 1, 10, 100, 1000) und einen DNA-Größenstandard (M). **(b)** Restriktionsanalyse des pET28a-*topA*-Plasmids. Plasmide wurden nach Wachstumsphasen von 16 h (Spuren 1 - 5) oder 6 h (Spuren 6 - 10) aus 10 transformierten Kolonien isoliert und mit *NcoI* und *NotI* gespalten. Spur M zeigt einen DNA-Größenstandard.

Die genaue Sequenz des klonierten *topA*-Gens wurde durch DNA-Sequenzierung ermittelt. Für die Sequenzierung wurden fünf unterschiedliche Primer verwendet. Um ein genaues Ergebnis zu erzielen und Fehler während der Sequenzierreaktion auszuschließen, wurden die Primer so gewählt, dass große Bereiche des *topA*-Gens zwei- bis dreimal sequenziert wurden. Das Einführen einer *NcoI*-Schnittstelle während der Klonierung führte zu einem Basenaustausch im *topA*-Gen. Während der Amplifikation wurde das dem Startcodon folgende Adenosin durch Guanin ersetzt. Dieser Austausch führte zu einer Änderung der Proteinsequenz der TmTop I. Das resultierende rekombinante Protein weist ein Alanin statt eines Serins an Position zwei auf. Von diesem Austausch abgesehen ist die TmTop I-Aminosäuresequenz des Konstruktes mit der des Wildtyps identisch (Abb. 3.2).

---

1	<u>MAKKVKKYIV</u>	VESPAKAKTI	KSILGNEYEV	FASMGHIIDL	PKSKFGVDLE	50
56	KDFEPEFAVI	KGKEKVVEKL	KDLAKKGELL	IASDMDREGE	AIAWHIARVT	100
101	NTLGRKNRIV	FSEITPRVIR	EAVKNPREID	MKKVRAQLAR	RILDRIVGYS	150
156	LSPVLWRNFK	SNLSAGRVQS	ATLKLVCBRE	REILRFVPPK	YHRITVNFDG	200
201	LTAEIDVKEK	KFFDAETLKE	IQSIDELVVE	EKKVSVKKFA	PPEPFKTSTL	250
251	QQEAYSKLGF	SVSKTMMIAQ	QLYEGVETKD	GHIAFITYMR	TDSTRVSDYA	300
301	KEEARNLITE	VFGEEYVGSK	RERRKSNAKI	QDAHEAIRPT	NVFMTPEEAG	350
351	KYLNSDQKKL	YELIWKRFLA	SQMKPSQYEE	TRFVLRTKDG	KYRFKGTVLK	400
401	KIFDGYEKVW	KTERNTGEFP	FEEGESVKPV	VVKIEEQETK	PKPRYTEGSL	450
451	VKEMERLGIG	RPSTYASTIK	LLLNRGYIKK	IRGYLYPTIV	GSSVMDYLEK	500
501	KYSDVVSVSF	TAEMEKDLDE	VEQGKTKDKI	VLREFYESFS	SVFDRNDRIV	550
551	VDFPTNQKCS	CGKEMRLSFG	KYGFYLKCEC	GKTRSVKNDE	IAVIDDGKIF	600
601	LGRKDSESGS	PDGRSVEGKGN	LSEKRRKGGK	KGS		633

---

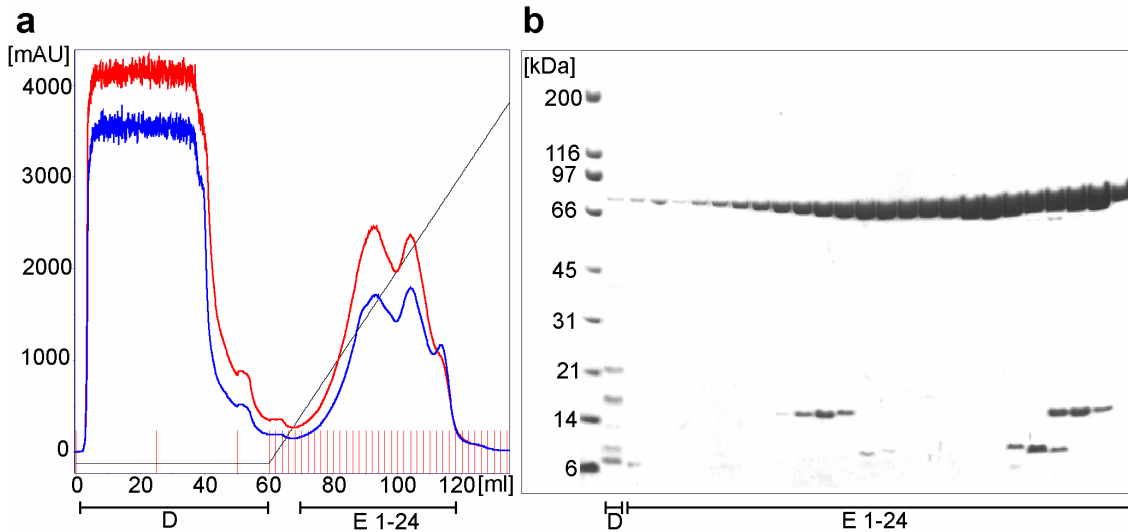
**Abb. 3.2:** Aminosäuresequenz des rekombinanten TmTop I-Proteins. Das ausgetauschte Alanin an Position zwei ist durch Unterstreichung markiert.

#### 3.1.2 Reinigung der TmTop I

Nach der Expression des Proteins in *E. coli* wurden die Zellen im ersten Schritt der TmTop I-Reinigung aufgeschlossen und *E. coli* Proteine durch Hitzepräzipitation bei 75 °C denaturiert. Denaturierte *E.coli*-Proteine konnten durch Zentrifugation entfernt werden, während die hitzestabile TmTop I in Lösung blieb. Mit Hilfe der nachfolgenden Ammoniumsulfat-Fällung, konnte das Protein weiter gereinigt und konzentriert werden. Im weiteren sollte mit Hilfe einer Ionenaustauschchromatographie verbleibende *E. coli*-Proteine abgetrennt werden. Für die Chromatographie wurde ein linearer Gradient von 0.1 M bis 1 M NaCl gewählt. Das resultierende Chromatogramm weist ein sehr breites Elutionsprofil auf (Abb. 3.3a). Das Absorptionsspektrum bei einer Wellenlänge von 280 nm zeigt eine stark ansteigende UV-Absorption bei einer NaCl-Konzentration von ca. 200 mM. Im weiteren Verlauf konnte eine hohe UV-Absorption mit mehreren nicht deutlich voneinander getrennten Maxima beobachtet werden. Bei NaCl-Konzentrationen über 0.5 M nahm die Absorption bei 280 nm wieder ab und erreichte bei einer Konzentration von 0.7 M einen stabilen Wert nahe der Nulllinie. Bemerkenswert ist die parallel mit der Absorption bei 280 nm ansteigende UV-Absorptionskurve bei einer Wellenlänge von 260 nm. Das Verhältnis der

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Absorptionswerte von 260 nm zu 280 nm lag in den meisten Fraktionen bei 1.4 : 1. Um die einzelnen Fraktionen genauer zu charakterisieren, wurde eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt (Abb. 3.3b).

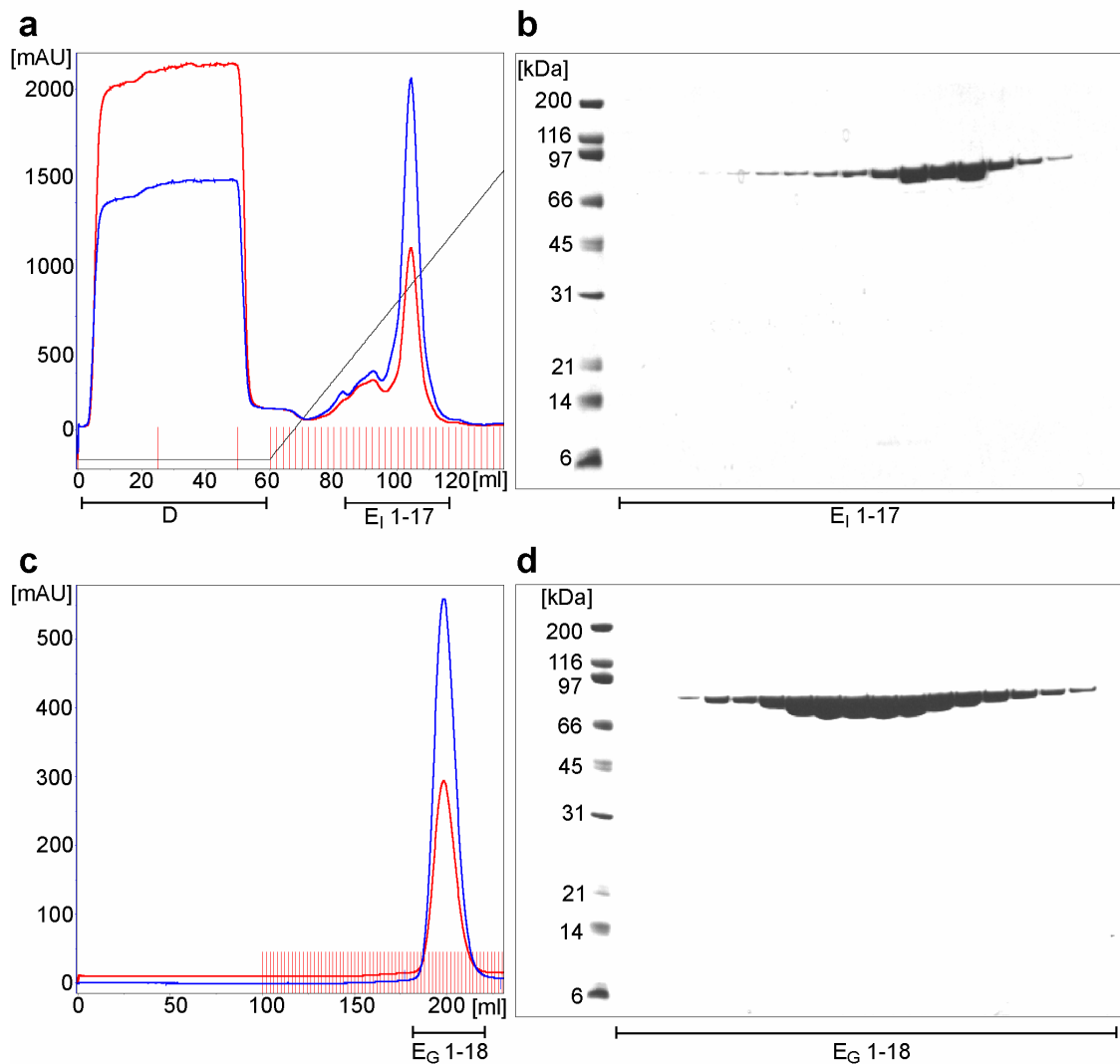


**Abb. 3.3:** Ionenaustauschchromatographie der TmTop I. Durchfluss (D); Eluat (E 1 – 24). **(a)** Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie mit Absorptionskurven bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot), Leitfähigkeit (schwarz). **(b)** Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie.

Die Coomassie-Färbung des SDS-Gels zeigt deutlich, dass nahezu das gesamte im Ausgangsmaterial vorhandene TmTop I an die Säule gebunden hatte. Nur eine sehr geringe Menge Protein befand sich in den Durchflussfraktionen (D). Die Eluatfraktionen E 7-24 wiesen sehr hohe Konzentrationen an TmTop I mit wenigen Verunreinigungen auf. Das ungewöhnliche Verhalten der TmTop I während der Chromatographie ist somit nicht auf verunreinigende Proteine zurückzuführen. Aufgrund des gleichzeitigen Ansteigens der UV-Absorption bei 260 nm und dem resultierenden Verhältnis der UV-Absorption von 260 nm zu 280 nm wurde vermutet, dass sich eine hohe Konzentration von Nukleinsäuren in den eluierten Fraktionen befand, die das breite Elutionsprofil der Probe verursachte

Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden verschiedene Methoden verwendet, die die Abtrennung oder den Abbau von Nukleinsäuren erlauben. Die erfolgreiche Reinigung gelang schließlich mit der Kombination einer DNA-Fällung mit Hilfe von Polyethylenimin (PEI) und dem Zusatz von DNase I vor Durchführung der Ionenaustauschchromatographie. Abbildung 3.4a zeigt das Chromatogramm der

Ionenaustauschchromatographie. Um die DNAse anschließend zu inaktivieren, wurde ein zweiter Hitzedenaturierungsschritt eingeführt. Eine darauf folgende Gelfiltrationschromatographie (Abb. 3.4c) ermöglichte neben der Analyse des Molekulargewichtes und des Oligomerisierungsverhaltens des gelösten Proteins auch dessen Überführung in eine für die Kristallisation geeignete Pufferlösung. Die bei der Eichung der verwendeten Gelfiltrationssäule ermittelten Retentionsvolumina sind in Tabelle 3.1 aufgeführt.



**Abb. 3.4:** Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration der TmTop I. Durchfluss (D); Eluat der Ionenaustauschchromatographie (E<sub>I</sub>, 1-18), Eluat der Gelfiltration (E<sub>G</sub> 1-18). **(a)** Chromatogramm der Ionenaustauschchromatographie mit Absorptionskurven bei 280 nm (blau) und 260 nm (rot), Leitfähigkeit (schwarz) **(b)** Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel mit Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie. **(c)** Chromatogramm der Gelfiltration. Absorptionskurven wie in (a). **(d)** Coomassie-Blau gefärbtes SDS Gel mit Fraktionen der Gelfiltration.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

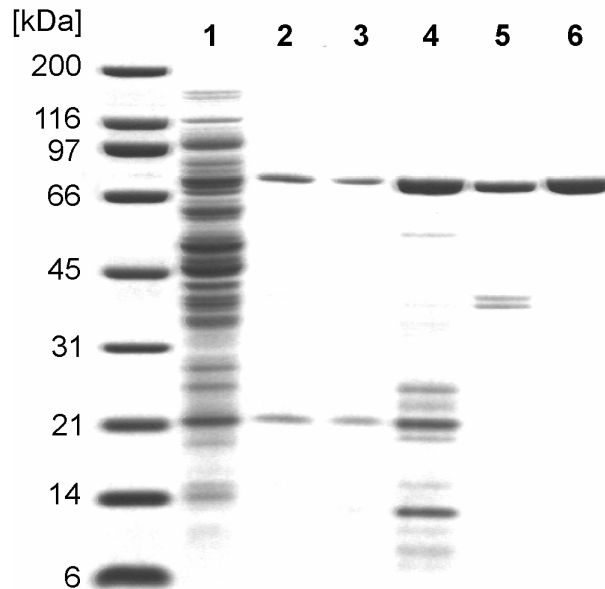
**Tab. 3.1:** Retentionsvolumina der Gelfiltrationschromatographie

Protein	Retentionsvolumen
Thyroglobulin (670 kDa)	121.9 ml
$\gamma$ -Globulin (158 kDa)	163.3 ml
Ovalbumin (44 kDa)	208.2 ml
Myoglobin (17 kDa)	242.8 ml
Vitamin B-12 (1.35 kDa)	296.0 ml
TmTop I	198.4 ml

Die Auswertung erfolgte durch lineare Regression des Eichlaufs, wobei anschließend mit Hilfe des Retentionsvolumens der TmTop I von 198.3 ml ein Molekulargewicht von 53.8 kDa berechnet wurde. Die Gelfiltration zeigt somit eindeutig, dass das Enzym in Lösung als Monomer vorliegt. Die Abweichung des ermittelten Molekulargewichtes vom berechneten Wert basierend auf der Aminosäurezusammensetzung (72.7 kDa) beruht wahrscheinlich auf der ungewöhnlichen Struktur des Proteins (siehe Kapitel 3.1.9).

#### 3.1.3 Proteinanalytik

Das optimierte Reinigungsprotokoll der TmTop I enthielt folgende Schritte: Zellaufschluss, erste Hitzepräzipitation, PEI-Fällung, Ammoniumsulfat-Fällung, DNase-Behandlung, zweite Hitzepräzipitation, Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration. Die verschiedenen Schritte wurden durch SDS-Gelelektrophorese analysiert. Die Ergebnisse der einzelnen Reinigungsschritte sind in Abbildung 3.5 zusammengefasst. Die TmTop I-Proteinprobe nach der Gelfiltration weist im SDS-Gel ein Molekulargewicht von ca. 72 kDa auf und ist frei von erkennbaren Verunreinigungen mit Fremdproteinen. Um den Reinheitsgrad der Proteinlösung exakt zu bestimmen, wurde eine Aminosäureanalyse durchgeführt. Das Resultat der Untersuchung bestätigte die hohe Reinheit der Proteinprobe mit einem Gehalt von 98.6 % TmTop I. Es konnten im Durchschnitt ca. 1 mg TmTop I pro Liter Kulturmedium gewonnen werden.

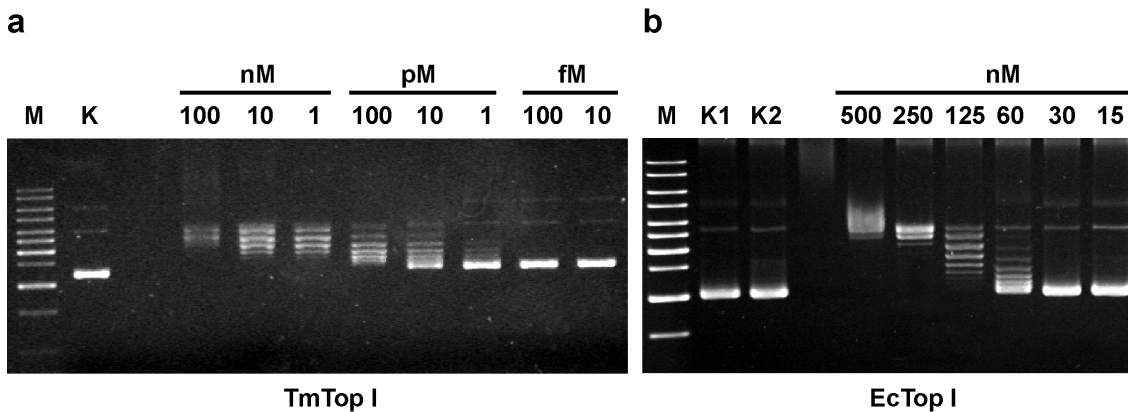


**Abb. 3.5:** Übersicht über die Reinigung rekombinanter TmTop I. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel mit entnommenem Material nach Zellaufschluss (1), Hitzedenaturierung (2), PEI-Fällung (3), Ammoniumsulfat-Fällung (4), Ionenaustauschchromatographie (5) und Gelfiltration (6). Das nach der Gelfiltration erhaltene Protein wurde für Kristallisationsexperimente eingesetzt.

Im folgenden Experiment sollte die Aktivität der gereinigten TmTop I analysiert werden. Da ein superspiralisiertes DNA-Molekül viel kompakter als ein entspanntes Molekül gleicher Länge ist, bewegt sich superspiralisierte DNA bei der Gelelektrophorese schneller als entspannte DNA. Die durch die Aktivität der Topoisomerase entstandenen DNA-Topoisomere lassen sich deshalb leicht mit einem Agarosegel sichtbar machen. TmTop I ist in der Lage, die Topologie von negativ superspiralisierter Plasmid-DNA zu modifizieren (Viard et al., 2001). Zur Bestimmung der Aktivität der TmTop I wurden DNA-Relaxationsexperimente mit negativ superspiralisierter pUC18-DNA als Substrat durchgeführt. Das Substrat wurde aus *E. coli* isoliert, gereinigt und TmTop I in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die Proben wurden bei 75°C, dem Temperaturoptimum des Enzyms, unter geeigneten Bedingungen inkubiert (Details siehe Material und Methoden). Nach 30 min wurde die Reaktion gestoppt, die entstandenen DNA-Topoisomere wurden mit Hilfe eines Agarosegels aufgetrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht (Abb. 3.6). Das Ergebnis dieses Experimentes zeigt eindeutig, dass die gereinigte TmTop I in der Lage ist, das Substrat umzusetzen. Während der Kontrollansatz (Abb. 3.6, Spur K) das superspiralisierte Plasmid zeigt, weisen Plasmide bei Anwesenheit von 100 mM bis 1 pM TmTop I ein

### 3 Ergebnisse und Diskussion

deutlich verändertes Laufverhalten auf (Abb. 3.6a). Das Substrat wird bei der Reaktion nur unvollständig umgesetzt, da das Enzym DNA-Einzelstrangregionen benötigt. Für die Ausbildung von Einzelstrangregionen ist aber ein gewisses Maß an negativer Superspiralisierung erforderlich. Das Agarosegel zeigt wie erwartet die unvollständige Entspiralisierung des Plasmids, die auf die Aktivität der Topoisomerase zurückzuführen ist.



**Abb. 3.6:** DNA-Relaxationsaktivität von Topoisomerasen I. Negativ superspiralisierte pUC18-Plasmid-DNA wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen TmTop I oder EcTop I inkubiert und die Produkte durch Elektrophorese analysiert. Konzentrationsangaben entsprechen der Gesamtkonzentration des Enzyms im Reaktionsansatz. Kontrollansatz ohne Protein (K, K1), Kontrollansatz mit 1 mM Glutathion-S-Transferase (K2), Molekulargewichtsstandard (M). **(a)** TmTop I. **(b)** EcTop I.

In der Literatur konnte in vergleichbaren Experimenten die Aktivität der TmTop I bis zu einer Mindestkonzentration von 0.1 fM im Ansatz nachgewiesen werden (Viard et al., 2001). Während im gezeigten Experiment pUC18-DNA als Substrat verwendet wurde, bestimmte Viard et al. (2001) die Aktivität der TmTop I anhand der Entspiralisierung von pTZ18-Plasmid-DNA. Die höhere TmTop I-Konzentration, die im oben beschriebenen Experiment benötigt wurde, beruht mit großer Wahrscheinlichkeit auf der Verwendung eines abweichenden DNA-Substrates.

Um das Ergebnis näher zu analysieren, wurde die Relaxationsaktivität von EcTop I bezüglich pUC18-DNA unter gleichen Bedingungen untersucht. Da das Temperaturoptimum von EcTop I bei 37°C liegt, wurden die Proben vor der gelelektrophoretischen Analyse bei dieser Temperatur inkubiert. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Ansatz mit 1 mM Glutathion-S-Transferase inkubiert (Spur K2). Das Agarosegel zeigt, dass die Aktivität von EcTop I bis zu einer Mindestkonzentration

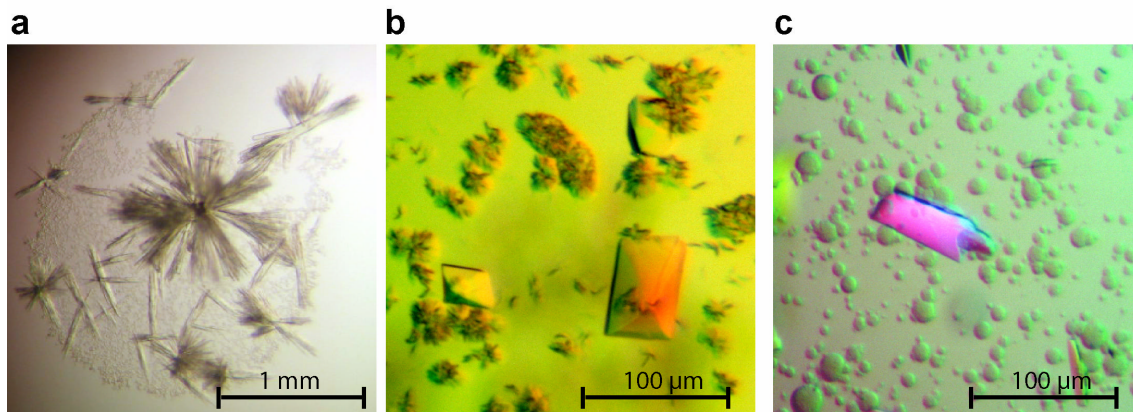


von 60 nM nachweisbar ist (Abb. 3.6b). Im Vergleich zu EcTop I weist TmTop I eine 60000-fach höhere Relaxationsaktivität auf. In der Literatur wird der Aktivitätsunterschied der beiden Enzyme bezüglich der Relaxation des pTZ18-Plasmids mit einem Faktor von mindestens 200 angegeben (Viard et al., 2001). Der Unterschied des ermittelten Faktors ist möglicherweise auf eine höhere Reinheit der TmTop I-Probe bezüglich des DNA-Gehaltes oder die Verwendung eines anderen DNA-Substrates beim Aktivitätstest zurückzuführen. Das Experiment zeigt zum einen, dass die gereinigte TmTop I eine im Vergleich zu EcTop I sehr viel höhere Relaxationsaktivität besitzt, die bezüglich des verwendeten Plasmids den in der Literatur angegebenen Wert weit übersteigt. Zum anderen scheinen pUC18-Plasmide im allgemeinen schlechtere Substrate für Typ IA-Topoisomerasen darzustellen.

### 3.1.4 Kristallisation der TmTop I

Zur Identifikation initialer Kristallisationsbedingungen wurden kommerziell erhältliche Kristallisationslösungen verwendet. Auf diese Weise konnten insgesamt 578 unterschiedliche Bedingungen auf ihre Fähigkeit untersucht werden, die Bildung von TmTop I-Kristallen zu fördern. Um den Einfluss der Temperatur auf das Kristallisationsverhalten zu berücksichtigen, wurden Kristallisationsansätze bei 18°C und 4°C gelagert. In Kristallisationsansätzen, die für acht Wochen bei 4°C gelagert wurden, konnte eine Bedingung identifiziert werden, die das Wachstum von nadelförmigen Proteinkristallen begünstigte (Abb. 3.7a). Eine intensive Optimierung dieser Bedingung führte schließlich zu Einkristallen, die für Diffraktionsmessungen geeignet waren (Abb. 3.7b und c). Die optimierten Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Kristalle erreichten Kantenlängen von 0.1 x 0.05 x 0.05 mm. Es konnten trikline und monokline Kristallformen der TmTop I hergestellt werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3.7:** Optimierung der Kristallisationsbedingungen. **(a)** TmTop I-Nadelkristalle erhalten aus initialen Kristallisationsexperimenten. **(b)** Optimierte TmTop I-Kristalle der Raumgruppe P1 unter polarisiertem Licht. **(c)** Optimierte TmTop I-Kristalle der Raumgruppe P2<sub>1</sub> unter polarisiertem Licht.

**Tab. 3.2:** Überblick über optimierte Kristallisationsbedingungen der TmTop I.

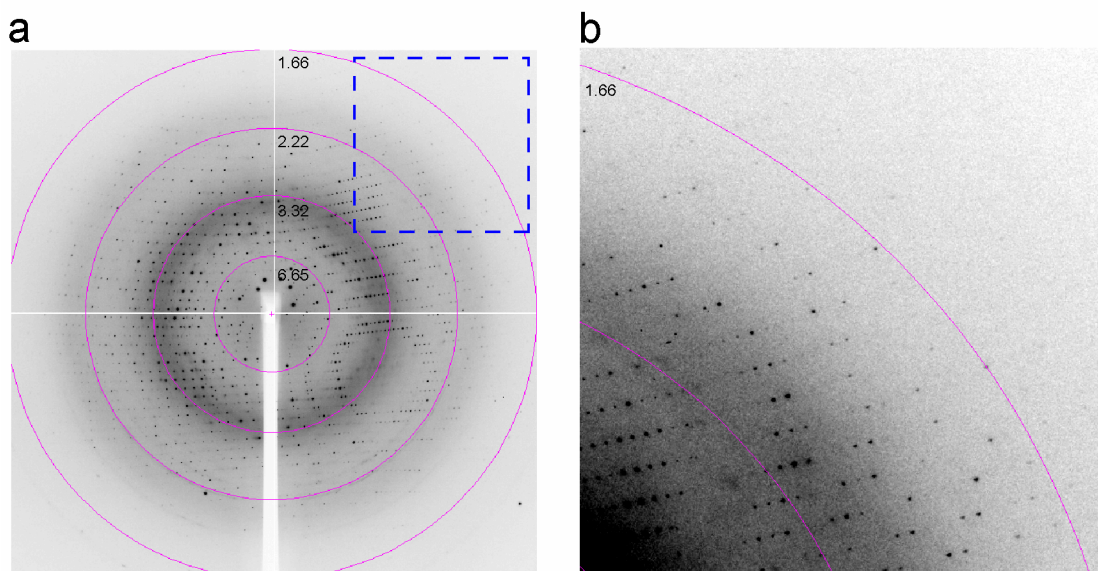
Kristallisationsbedingung	TmTop I - trikline Kristallform
Reservoir	33 % Jeffamine M-600, pH 7.5 100 mM Natriumcitrat/HCl, pH 4.8
Proteinkonzentration	7 mg/ml
Proteinpuffer	20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl
Temperatur	18 °C
Tropfen	1 µl Proteinlösung + 1 µl Reservoir

Kristallisationsbedingung	TmTop I - monokline Kristallform
Reservoir	34 % Jeffamine M-600, pH 7.5 100 mM MES/NaOH pH 6.0 64 mM Natriumcitrat
Proteinkonzentration	7 mg/ml
Proteinpuffer	20 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl
Temperatur	18 °C
Tropfen	1 µl Proteinlösung + 1 µl Reservoir

### 3.1.5 Diffraktionsmessungen

Der erste Datensatz der triklinen Kristallform der TmTop I wurde am SLS (Villingen) aufgenommen. Wegen der eng begrenzten Messzeit von 45 min und der niedrigen Symmetrie der Kristallform konnte dieser Kristall lediglich bis zu einer Auflösungsgrenze von 2.5 Å vermessen werden. Mit denen am ESRF (Grenoble) aufgenommenen Datensätzen der triklinen und monoklinen Kristallformen der TmTop I konnten deutlich höhere Auflösungen von 1.7 Å bzw. 1.95 Å erreicht werden. Abbildung 3.8 zeigt beispielhaft eine Diffraktionsaufnahme aus einem Datensatz der triklinen Kristallform.



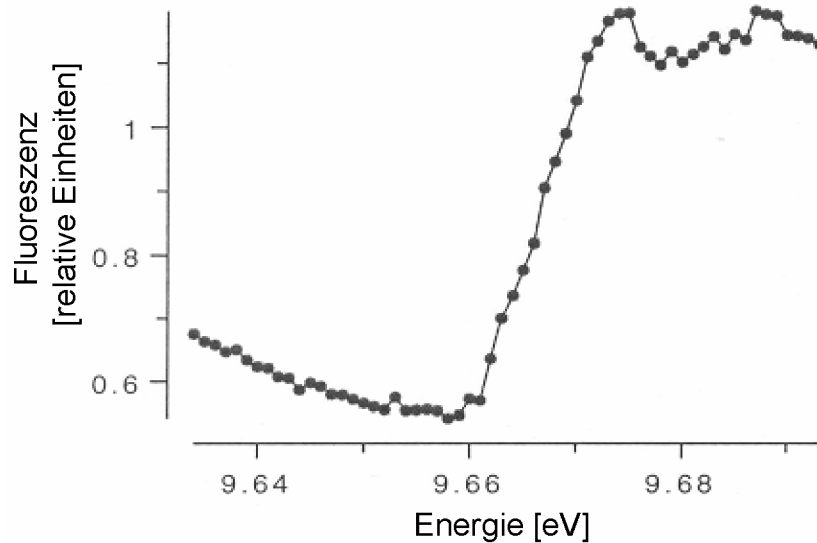
**Abb. 3.8:** Diffraktionsaufnahme der triklinen Kristallform der TmTop I. **(a)** Diffraktionsaufnahme des Datensatzes bis zu einer Auflösung von 1.7 Å. **(b)** Vergrößerung des in (a) markierten Bereichs.

Durch biochemische Analysen ist bekannt, dass TmTop I ein Zink-Ion pro Molekül enthält (Viard et al, 2001). Durch Aminosäureaustausche in der C-terminalen Region des Proteins, die aufgrund der Aminosäuresequenz ein mögliches Zink-Finger-Motiv aufweist, konnte die Zink-Bindestelle identifiziert werden (Viard et al., 2001). Das Zink-Ion konnte in diesen Studien in Fraktionen der TmTop I nach der Reinigung des Proteins eindeutig nachgewiesen werden. Um den anomalen Streubetrag des Zink-Ions für die Röntgenstrukturanalyse des Proteins nutzen zu können, wurde ein SAD-

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Diffractionsexperiment (SAD, engl. *single anomalous dispersion*) durchgeführt. Der geringe anomale Streubeitrag macht bei SAD-Diffractionsexperimenten eine sehr hohe Qualität der gesammelten Daten und eine hohe Redundanz erforderlich. Aufgrund der höheren Symmetrie der monoklinen Kristallform wurde ein TmTop I-Kristall der Raumgruppe  $P2_1$  für SAD-Diffractionsexperimente ausgewählt. Zur Bestimmung der Absorptionskante des Zink-Ions wurde ein Röntgenfluoreszenzspektrum aufgenommen. Abbildung 3.9 zeigt das Diagramm, mit dessen Hilfe die Zink-Absorptionskante bei einer Wellenlänge von 1.2815 Å bestimmt werden konnte.



**Abb. 3.9:** Röntgenfluoreszenzspektrum eines monoklinen TmTop I-Kristalls.

Alle gemessenen Datensätze der TmTop I weisen eine Vollständigkeit von mehr als 92 % und eine gute Datenqualität auf. Die Tabelle 3.3 zeigt die wichtigsten statistischen Parameter der gemessenen Diffraktionsdatensätze. Obwohl die Röntgenreflexe der monoklinen Kristallform nach der Indizierung auf eine orthorhombische Laue-Symmetrie hindeuten, gelang eine Integration des kompletten Datensatzes nicht. Die Integration unter Anwendung monokliner Laue-Symmetrie zeigte, dass der kristallographische Winkel  $\beta$  mit  $90,84^\circ$  signifikant von  $90^\circ$  abweicht. Mit Hilfe der systematischen Auslöschungen nach der Skalierung konnte als Raumgruppe  $P2_1$  eindeutig bestimmt werden.

**Tab. 3.3:** Statistische Parameter der gemessenen Diffraktionsdatensätze der TmTop I

	P1	P1	P2 <sub>1</sub>
Raumgruppe	P1	P1	P2 <sub>1</sub>
Messplatz	PX1 (SLS)	ID29 (ESRF)	ID29 (ESRF)
Wellenlänge (Å)	0.9190	0.9756	1.2815
Gitterkonstanten (Å)	a=44.90, b=94.24, c=95.63 $\alpha=83.7^\circ$ , $\beta=86.1^\circ$ , $\gamma=84.8^\circ$	a=45.12, b=95.42, c=96.51 $\alpha=83.4^\circ$ , $\beta=86.2^\circ$ , $\gamma=84.9^\circ$	a=45.05, b=142.71, c=127.64 $\alpha=\gamma=90^\circ$ , $\beta=90.84^\circ$
Auflösung (Å)	63-2.5	45-1.7	45-1.95
gemessene Reflexe	190918	1812308	2165191
unabhängige Reflexe	53590	167812	116615
Vollständigkeit (%) <sup>a</sup>			
insgesamt	92.9 (63-2.5 Å)	95.6 (45-1.7 Å)	99.6 (45-1.95 Å)
höchste Auflösung	94.3 (2.59-2.5 Å)	95.1 (1.79-1.7 Å)	99.1 (2.06-1.95 Å)
I/sigma			
insgesamt	10.5 (63-2.5 Å)	10.5 (45-1.7 Å)	8.2 (45-1.95 Å)
höchste Auflösung	2.8 (2.59-2.5 Å)	3.0 (1.79-1.7 Å)	2.7 (2.06-1.95 Å)
Redundanz			
insgesamt	1.7 (63-2.5 Å)	3.0 (45-1.7 Å)	4.0 (45-1.95 Å)
höchste Auflösung	1.7 (2.59-2.5 Å)	3.0 (1.79-1.7 Å)	3.7 (2.06-1.95 Å)
R <sub>merge</sub> <sup>b</sup>			
insgesamt	0.07 (63-2.5 Å)	0.07 (45-1.7 Å)	0.12 (45-1.95 Å)
höchste Auflösung	0.27 (2.59-2.5 Å)	0.44 (1.79-1.7 Å)	0.44 (2.06-1.95 Å)

<sup>a</sup> Verhältnis der Anzahl der möglichen Reflexe zur Anzahl der gemessenen Reflexe

<sup>b</sup>  $R_{merge} = \frac{\sum h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum h \sum_i I(h,i)}$ .  $I(h,i)$  ist die Intensität der i-ten Messung von h und  $\langle I(h) \rangle$  ist der zugehörige Mittelwert von h über alle Messungen von h. Alle Messungen wurden summiert.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

#### 3.1.6 Analyse des Inhaltes der asymmetrischen Einheit

Unter Verwendung eines aus der Aminosäuresequenz der TmTop I berechneten Molekulargewichtes von 72.7 kDa wurde die Anzahl der TmTop I-Moleküle pro asymmetrische Einheit (AU) bestimmt (Tab. 3.4; Matthews, 1968). Die Ergebnisse deuteten für beide Kristallformen auf zwei Moleküle pro asymmetrische Einheit hin. Der Lösungsmittelgehalt lag für die trikline und die monokline Kristallform der TmTop I bei 56%.

**Tab. 3.4:** Inhalt der asymmetrischen Einheiten der TmTop I-Kristalle.

Raumgruppe	Moleküle pro AU	V <sub>m</sub> [Å <sup>3</sup> /Da]	Lösungsmittelanteil [%]
P1	2	2.8	56.1
P2 <sub>1</sub>	2	2.8	56.1

Die Selbstrotationsfunktionen der beiden Datensätze wurden unter Verwendung von Daten im Bereich 40 Å bis 3.0 Å berechnet. Das erhaltene Maximum weist auf eine zweizählige nicht-kristallographische Symmetrie der Moleküle in der asymmetrischen Einheit der triklinen Kristallform hin. In Tabelle 3.5 sind die intensivsten Maxima der Selbstrotationsfunktion der triklinen Kristallform aufgeführt.

**Tab. 3.5:** Maxima der Selbstrotation der triklinen Kristallform der TmTop I. Die Tabelle zeigt zusätzlich das erste nicht signifikante Maximum der Selbstrotationsfunktion.

theta [°]	phi [°]	chi [°]	I/sigma	Interpretation
0.00	0.00	0.00	25.37	Ursprungspik
31.54	-89.88	180.00	18.66	NCS
83.38	-12.93	180.00	5.02	nicht signifikant

Die Selbstrotationsfunktion für die monokline Kristallform zeigte überraschenderweise kein weiteres signifikantes Maximum neben dem Ursprungsmaximum. Um den Inhalt der asymmetrischen Einheit der monoklinen TmTop I-Kristalle näher zu analysieren, wurde eine native Pattersonfunktion in einem Auflösungsbereich von 40 Å bis 3 Å berechnet. Diese Methode ermöglicht den Nachweis von nicht-kristallographischer Translationssymmetrie (Pseudotranslation) innerhalb der asymmetrischen Einheit eines Kristalls. Die intensivsten Maxima der Pattersonfunktion sind in Tabelle 3.6 aufgeführt. Die Lösung zeigt, dass zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit über eine Translation miteinander in Beziehung stehen. Interessanterweise sind die beiden Moleküle um jeweils ca. eine halbe Länge der Einheitszelle in Richtung der kristallographischen Achsen b und c voneinander entfernt.

**Tab. 3.6:** Maxima der Pattersonfunktion der monoklinen Kristallform der TmTop I. Die Tabelle zeigt zusätzlich das erste nicht signifikante Maximum der Pattersonfunktion.

Fraktionalkoordinaten			relative Höhe	Interpretation
a	b	c		
0	0	0	164	Ursprung
0.170	0.500	0.507	70	NCS
0.036	0.021	0.023	8	nicht signifikant

Mit Hilfe von Selbstrotations- und Pattersonfunktionen konnte der Inhalt der asymmetrischen Einheiten beider TmTop I-Kristallformen eindeutig bestimmt werden. Während die zwei Moleküle der triklinen Kristallform durch eine zweizählige nicht-kristallographische Achse miteinander verwandt sind, können die Moleküle in der monoklinen Form durch eine Translation ineinander überführt werden.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

---

### 3.1.7 Strukturlösung und Verfeinerung

Ein erstes Modell der Struktur der TmTop I wurde durch Molekularen Ersatz unter Verwendung des am SLS gemessenen Datensatzes eines triklinen Kristalls bis zu einer Auflösung von 2.5 Å erhalten. Als Suchmodell in den Rechnungen zum Molekularen Ersatz wurde die Struktur der Topoisomerase I aus *E. coli* eingesetzt (Lima et al., 1995; 1ECL). Die Ergebnisse der Kreuzrotationsfunktion sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Es konnten zwei Lösungen identifiziert werden, die sich bezüglich der berechneten Korrelationsfaktoren (Strukturfaktoramplituden, Intensität, Pattersonkorrelationsfaktor) und des R-Wertes deutlich von den übrigen Lösungen abhoben. Eine darauf folgende Translationssuche mit diesen Rotationslösungen lieferte je eine Translationslösung mit sehr guten Qualitätsparametern (Tab. 3.7). Die Lösung bestätigte die Ergebnisse der Selbstrotationsfunktion, die zwei Molekülen mit zweizähliger nicht-kristallographischer Symmetrie pro asymmetrische Einheit ergab.



**Tab. 3.7:** Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz der triklinen Kristallform der TmTop I. Die ermittelten Lösungen für beide Moleküle der asymmetrischen Einheit sind untereinander aufgeführt. Die Translationsvektoren sind in Fraktionalkoordinaten angegeben, neben dem Korrelationsfaktor für beobachtete und berechnete Strukturfaktoramplituden ist der von AmoRE berechnete R-Wert aufgeführt.

	Rotation	Translation	Korrelationsfaktor	R-Wert
<b>Rotationssuche</b>	$\alpha=204.95^\circ$ $\beta=96.1^\circ$ $\gamma=28.35^\circ$		23.8	54.4
	$\alpha=350.02^\circ$ $\beta=113.22^\circ$ $\gamma=228.34^\circ$		22.2	54.8
<b>Translationssuche</b>	$\alpha=204.95^\circ$ $\beta=96.1^\circ$ $\gamma=328.35^\circ$	x=0 y=0 z=0	23.8	54.4
	$\alpha=350.02^\circ$ $\beta=113.22^\circ$ $\gamma=228.34^\circ$	x=-0.3132 y=-0.4323 z=0.4308	29.5	52.8
<b>Verfeinerung</b>	$\alpha=205.32^\circ$ $\beta=95.84^\circ$ $\gamma=327.88^\circ$	x=0.0005 y=-0.00050 z=0.0001	39.3	51.5
	$\alpha=350.35^\circ$ $\beta=113.33^\circ$ $\gamma=227.97^\circ$	x=-0.3124 y=-0.4329 z=0.4328		

Bei der Analyse der Kristallpackung zeigte sich, dass die zwei Moleküle des Suchmodells in der asymmetrischen Einheit des Kristalls eine Reihe von unvorteilhaften Kontakten aufwiesen. Diese Kontakte waren besonders deutlich zwischen den Domänen II der Moleküle. Mit Hilfe der aus dem Modell resultierenden Phasen wurden Elektronendichtekarten berechnet. In diesen Karten war die Proteinhauptkette des Modells in bestimmten Bereichen recht gut durch Elektronendichte definiert, andere Bereiche insbesondere die Hauptkette der Domäne II war zum großen Teil nicht oder nur sehr schlecht definiert. Eindeutige Elektronendichten für Proteinseitenketten waren nur in wenigen Fällen erkennbar (Abb. 3.10a).

Ausgehend von diesem Modell wurde versucht, die Struktur von fehlenden Bereichen des Proteins zu erhalten. Hierzu wurde eine schrittweise manuelle Anpassung des

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

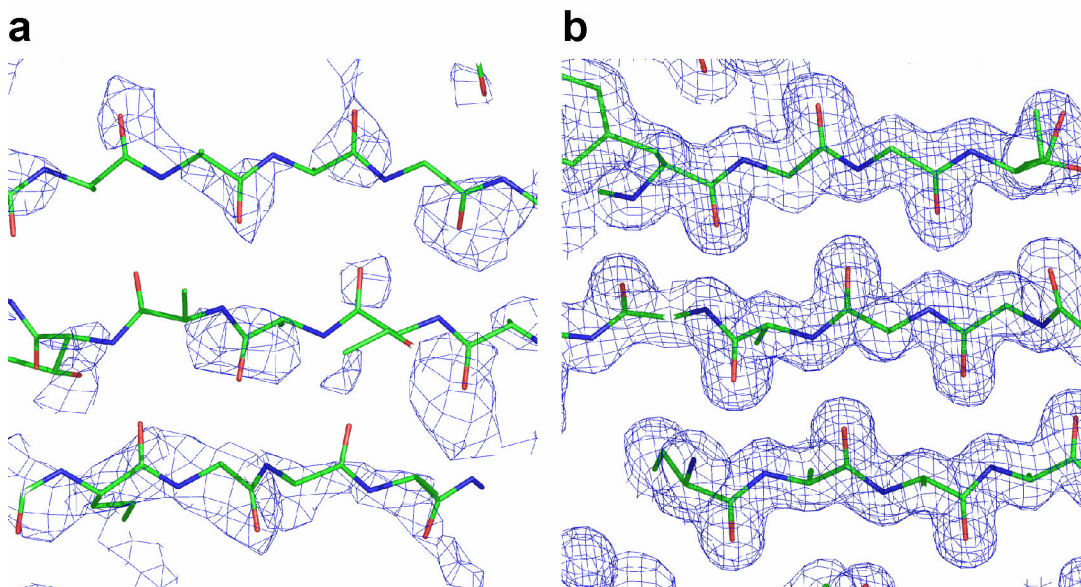
Modells in Verbindung mit darauf folgenden molekularen Verfeinerungsrechnungen mit dem Programm REFMAC (CCP4, 2001) durchgeführt. Bereiche der Proteinhauptkette, die nicht eindeutig durch Elektronendichte definiert waren, wurden aus dem Modell entfernt. Schlecht definierte Aminosäureseitenketten wurden durch Alanin ersetzt. Das resultierende Modell enthielt schließlich lediglich 52 % der Proteinhauptkette und 34 % der Aminosäureseitenketten der TmTop I. Um bessere Elektronendichten für fehlende Bereiche des Modells zu erhalten, wurde eine Mittelung der Elektronendichte für die beiden Moleküle der asymmetrischen Einheit vorgenommen. Auch mit dieser Vorgehensweise konnte keine signifikante Verbesserung der Elektronendichtekarten für fehlende Bereiche des Modells erzielt werden. Versuche, zusätzliche Aminosäuren manuell in die vorhandene Elektronendichte einzupassen und so bessere Phaseninformationen zu erhalten, führten nicht zum Erfolg.

Die Lösung der Gesamtstruktur der TmTop I gelang schließlich mit einem am ESRF aufgenommenen Datensatz bis mit einer Auflösungsgrenze von 1.7 Å. Mit Hilfe des Programms ARP/wARP unter Verwendung des vorhandenen unvollständigen Modells konnten fehlende Bereiche der Struktur modelliert werden. Der automatische Modellbau lieferte nach 100 Zyklen ein Modell, das 88 % der Aminosäuren der TmTop I-Sequenz enthielt. Die auf Grundlage dieser Struktur berechneten Elektronendichten erlaubten die vollständige Modellierung der Struktur durch abwechselnde manuelle Anpassung und molekulare Verfeinerungsrechnungen. Die wichtigsten Schritte der Verfeinerung sind in Tabelle 3.8 dokumentiert. Die endverfeinerte Struktur besteht aus 581 Aminosäuren pro Molekül und insgesamt 1054 Wassermolekülen. Abbildung 3.10 zeigt die Elektronendichte eines Bereiches der schlecht definierten Domäne II im ursprünglichen Modell nach dem Molekularen Ersatz im Vergleich zur Elektronendichte der endverfeinerten Struktur.

Bemerkenswerterweise gelang die Lösung der Struktur erst bei der Verwendung des manuell angepassten Modells als Eingabe für den automatischen Modellbau in ARP/wARP. Versuche, die Struktur mit der nicht modifizierten EcTop I zu lösen, führten nicht zum Erfolg. In den resultierenden Modellen fehlten weiterhin große Teile der Proteinhauptkette, eine Verbesserung der Elektronendichtekarten war nicht festzustellen.

Tab. 3.8: Verfeinerung der TmTop I-Struktur, trikline Raumgruppe.

Schritt	$R_{work}$ [%]	$R_{free}$ [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	25.6	27.5	-	Modell nach erster Verfeinerung
2	25	27	-	Modell nach manueller Anpassung
3	20.1	23.7	1054	Modell nach Wassereinbau
4	19.7	23.2	1054	Modell nach TLS-Verfeinerung



**Abb. 3.10:** Verbesserung der Elektronendichtekarten während Modellbau und Verfeinerung. Das Protein ist durch ein Stabmodell (grün) dargestellt. Atome sind wie folgt angefärbt: Sauerstoff, rot; Stickstoff, blau. Eine  $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichtekarte (konturiert bei  $1.5\sigma$ ) ist in blau dargestellt. **(a)** Elektronendichte eines  $\beta$ -Faltblattes in Domäne II ( $\beta$ -Stränge 8-10) nach Molekularem Ersatz. **(b)** Elektronendichte derselben Region in der endverfeinerten Struktur.

Die Struktur der monoklinen Kristallform der TmTop I wurde durch Molekularen Ersatz unter Verwendung der verfeinerten Struktur der triklinen Kristallform gelöst. Die Ergebnisse der Kreuzrotations- und Translationsfunktion sind in Tabelle 3.9 aufgeführt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

**Tab. 3.9** Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz der monoklinen Kristallform der TmTop I. Die ermittelten Lösungen für beide Moleküle der asymmetrischen Einheit sind untereinander aufgeführt. Die Translationsvektoren sind in Fraktionalkoordinaten angegeben, neben dem Korrelationsfaktor für beobachtete und berechnete Strukturfaktoramplituden ist der von AmoRE berechnete R-Wert aufgeführt.

	Rotation	Translation	Korrelationsfaktor	R-Wert
<b>Rotationssuche</b>	$\alpha=193.35^\circ$ $\beta=80.31^\circ$ $\gamma=12.06^\circ$		30.5	59.0
<b>Translationssuche</b>	$\alpha=193.35^\circ$ $\beta=80.31^\circ$ $\gamma=12.06^\circ$	x=0.2656 y=0 z=0.0341	35.9	57.7
		x=0.0938 y=-0 z=0.0284	36.3	58.2
<b>Verfeinerung</b>	$\alpha=193.3^\circ$ $\beta=80.2^\circ$ $\gamma=11.99^\circ$	x=0.2596 y=0.0001 z=-0.4995	85.5	30.9
	$\alpha=193.7^\circ$ $\beta=80.05^\circ$ $\gamma=11.91^\circ$	x=0.0891 y=0.0368 z=-0.4696		

Die Struktur wurde analog zur triklinen Kristallform der TmTop I durch abwechselnden manuellen Modellbau und molekulare Verfeinerungsrechnungen mit REFMAC (CCP4, 2001) angepasst. Tabelle 3.10 zeigt die wichtigsten Schritte der Verfeinerung. Die endverfeinerte Struktur besteht aus 581 Aminosäuren pro Molekül und enthält insgesamt 877 Wassermoleküle.

**Tab. 3.10:** Verfeinerung der TmTop I-Struktur, monokline Raumgruppe.

Schritt	$R_{work}$ [%]	$R_{free}$ [%]	Wassermoleküle	Strukturmodell
1	25.3	28.8	-	Modell nach erster Verfeinerung
2	25.1	28.6	-	Modell nach manueller Anpassung
3	20.0	24.9	877	Modell nach Wassereinbau
4	19.5	24.6	877	Modell nach TLS-Verfeinerung

### 3.1.8 Qualität der TmTop I-Strukturen

Die Qualität der verfeinerten Modelle wurde anhand der stereochemischen Parameter der Verfeinerungsprogramme, visueller Inspektion der Elektronendichtekarten und Ramachandran-Plots beurteilt. Tabelle 3.11 zeigt die wichtigsten statistischen Parameter der verfeinerten Strukturen. Die endgültigen Modelle der triklinen und der monoklinen Kristallform der TmTop I bestehen aus jeweils zwei Molekülen pro asymmetrische Einheit. Die Modelle enthalten 581 Aminosäuren pro Molekül, dies entspricht 91.8 % der Aminosäuresequenz des Enzyms. Im Hinblick auf die hohe Auflösung der Datensätze sind die erzielten R-Werte von ca. 20 % für  $R_{work}$  und ca. 24 % für  $R_{free}$  zufriedenstellend. Die ermittelten stereochemischen Parameter für Bindungslängen und Bindungswinkel sind verglichen mit den Idealwerten nach Engh und Huber (1991) sehr gut. Die Abweichungen liegen in Bereichen, die für Strukturen mit ähnlichen Auflösungen erwartet werden. Die berechneten Elektronendichten sind für alle in den Strukturen enthaltenen Atome eindeutig. Flexible Bereiche des Proteins, die nicht durch Elektronendichte definiert sind, wurden nicht modelliert.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

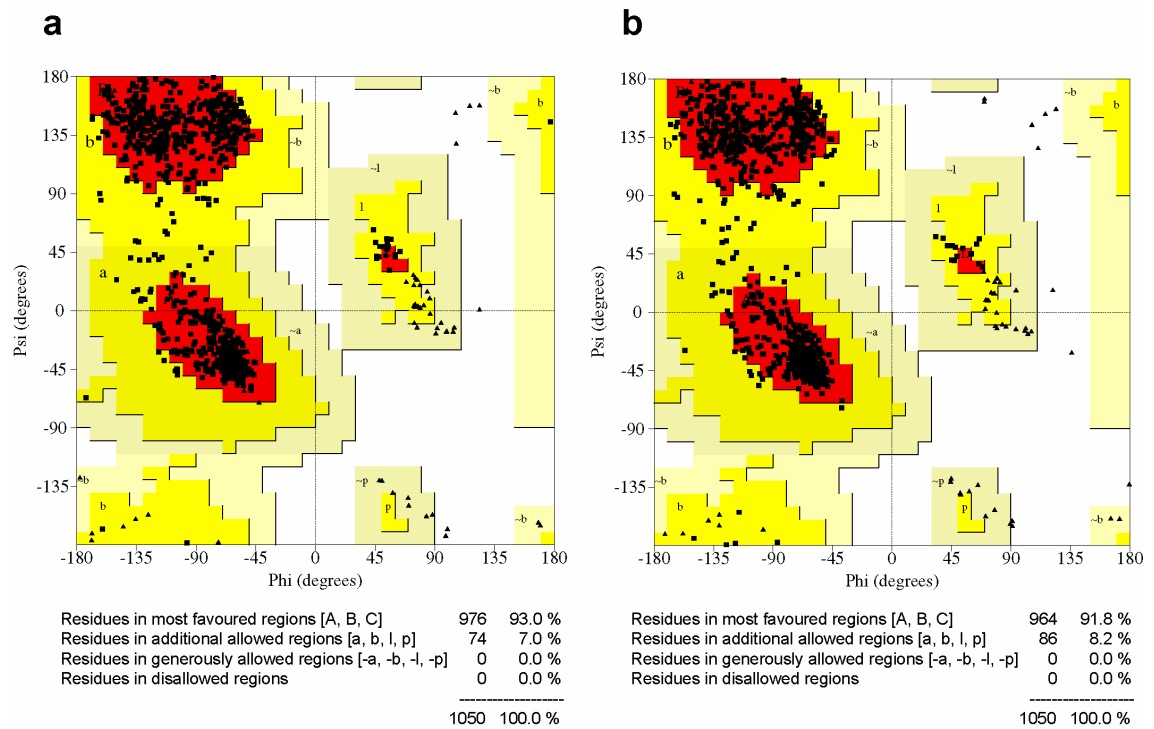
**Tab. 3.11:** Statistische Parameter der verfeinerten TmTop I-Strukturen.

Raumgruppe	P1	P2 <sub>1</sub>
Auflösungsbereich (Å)	45-1.7	45-1.95
Moleküle pro asymmetrischer Einheit	2	2
Anzahl der Atome (ohne Wasserstoffatome)	10600	10305
Anzahl der Wassermoleküle	1054	877
R-Faktoren (%) <sup>a</sup>		
insgesamt	19.7 (23.2)	19.5 (24.6)
höchste Auflösungsschale <sup>b</sup>	25.3 (32.6)	27.0 (30.0)
isotrope B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )		
alle Proteinatome	26.53	24.69
Hauptkettenatome	23.81	22.69
Seitenkettenatome	27.38	25.81
Wasseratome	34.67	29.22
RMS-Abweichungen von Idealwerten		
Bindungslängen (Å)	0.014	0.014
Bindungswinkel (°)	1.8	2.0
RMS-Abweichungen zwischen Molekülen in der AU (Å)		
C $\alpha$ - Atome	0.36	0.33
alle Proteinatome	0.65	0.66

<sup>a</sup>  $R = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|}$ , Wert für  $R_{free}$  in Klammern

<sup>b</sup> 1.74–1.7 Å für P1 und 2.0–1.95 Å für P2<sub>1</sub>

Ramachandran-Plots zeigen, dass in beiden Strukturen über 90 % der Reste in den am stärksten favorisierten Regionen liegen (Abb. 3.11). Die restlichen Aminosäuren liegen in zusätzlich erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots. Es finden sich keine Aminosäurereste in Regionen, die als „*generously allowed*“ oder „*disallowed*“ definiert sind, dies weist auf eine sehr hohe Qualität der Strukturen hin.



**Abb. 3.11:** Ramachandran-Plots der Strukturen der triklinen und monoklinen Kristallformen der TmTop I. A, B, L (rot): *most favoured regions*, a, b, l (gelb): *additionally allowed regions*, ~a, ~b, ~c (hellgelb): *generously allowed regions*, weiß: *disallowed regions*. **(a)** TmTop I, trikinie Kristallform. **(b)** TmTop I, monokline Kristallform.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

---

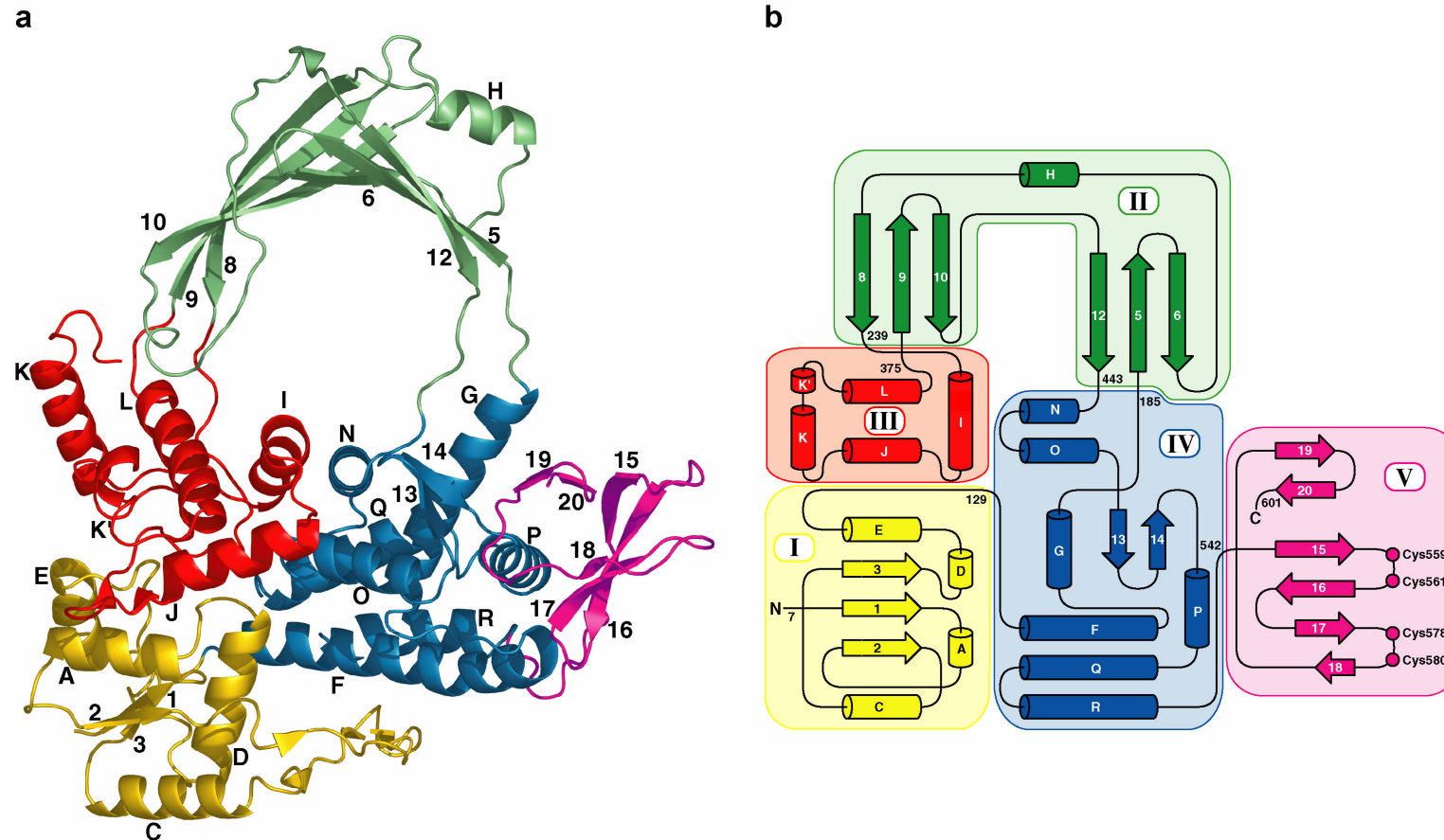
### 3.1.9 Übersicht über die Struktur der TmTop I

Die Analyse der asymmetrischen Einheit der triklinen Kristallform zeigte, dass die beiden enthaltenen TmTop I-Moleküle grundsätzlich identisch sind. Eine Überlagerung der Strukturen ergab eine RMS-Abweichung von 0.36 Å für C $\alpha$ -Atome, die durch geringe konformationelle Unterschiede der Moleküle verursacht wird. Die Regionen, in denen Unterschiede lokalisiert sind, befinden sich zumeist in Oberflächenloops oder anderen flexiblen Bereichen des Proteins. Eine Analyse der asymmetrischen Einheit der monoklinen Kristallform ergab ein ähnliches Bild mit einer RMS-Abweichung von 0.33 Å für C $\alpha$ -Atome. Auch beim Vergleich der Moleküle der beiden Raumgruppen untereinander waren keine grundlegenden konformationellen Unterschiede festzustellen, die RMS-Abweichungen für C $\alpha$ -Atome lagen zwischen 0.25 Å und 0.34 Å. Im folgenden wird deshalb die Struktur nur eines TmTop I-Moleküls im Detail beschrieben. Strukturelle Flexibilität, wie sie in Bereichen des Proteins zu vermuten ist, welche unterschiedliche Konformationen in kristallographisch unabhängigen Molekülen aufweisen, wird in den jeweiligen Kapiteln diskutiert.

Die TmTop I weist die typische Faltung von Topoisomerasen des Typs IA auf, die bereits von strukturell charakterisierten Mitgliedern dieser Proteinfamilie bekannt ist. Der N-terminale Bereich des Enzyms besitzt große strukturelle Ähnlichkeit zu äquivalenten Bereichen anderer Topoisomerasen des IA Typs, insbesondere zum N-terminalen Fragment der EcTop I (Aminosäurereste 1–581; Lima et al, 1994) und den Domänen I-IV der EcTop III (Aminosäurereste 1-609; Mondragon und DiGate, 1999). Die Strukturen der EcTop I (40 % Sequenzidentität) und der EcTop III (18 % Sequenzidentität) können mit der Struktur der TmTop I mit niedrigen RMS-Abweichungen für C $\alpha$ -Atome von 1.5 Å bzw. 4.9 Å überlagert werden. Die Domänen I-IV der TmTop I sind so angeordnet, dass eine ringförmige Struktur mit Abmessungen von 95 Å x 60 Å x 45 Å entsteht (Abb. 3.12a). Im Zentrum dieser Struktur befindet sich eine Öffnung mit einem Durchmesser von ungefähr 25 Å. Ein flexibler Loop (Aminosäuren 543–550) verbindet den N-terminalen Bereich des Enzyms mit einer globulären C-terminalen Domäne mit Abmessungen von 25 Å x 20 Å x 15 Å. Diese Domäne enthält das Zink-Bindemotiv des Enzyms. Die Kristallstruktur der TmTop I enthält alle wichtigen Bereiche des aktiven Enzyms, lediglich sechs Aminosäuren am N-Terminus (Aminosäuren 1 – 6), ein Loop an der Moleküloberfläche (Aminosäurereste 319-332) und die letzten 32 Aminosäuren (Aminosäurereste 602-633) fehlen im verfeinerten Strukturmodell. Abbildung 3.12b zeigt ein Topologiediagramm der TmTop I, in dem die Sekundärstrukturelemente und deren Anordnung in der Struktur



zu erkennen sind. Um die Struktur der TmTop I leichter mit homologen Enzymen vergleichen zu können, wurden die einzelnen Sekundärstrukturelemente nach der von Lima et al. (1994) verwendeten Nomenklatur für EcTop I benannt.



**Abb. 3.12:** Übersicht über die Struktur der TmTop I. Die einzelnen Domänen des Enzyms sind wie folgt gefärbt: Domäne I, gelb; Domäne II, grün; Domäne III, rot; Domäne IV blau und Domäne V violett.  $\alpha$ -Helices sind durch Buchstaben (A-R),  $\beta$ -Faltblätter durch Ziffern (1-20) gekennzeichnet. **(a)** Schleifenmodell der TmTop I-Struktur. **(b)** Topologiediagramm mit Sekundärstrukturelementen des Modells. Arabische Ziffern außerhalb von Sekundärstrukturelementen bezeichnen den letzten Aminosäurerest der jeweiligen Domäne. Die Aminosäurereste 7 und 601 kennzeichnen die erste bzw. die letzte Aminosäure des Strukturmodells. Die Cysteine 559, 561, 578 und 580 in Domäne V sind als Kreise dargestellt.  $\beta$ -Stränge der Domänen I-IV mit weniger als drei Resten sind nicht dargestellt.

Domäne I (Aminosäurereste 7-129) ist aus einem dreisträngigen parallelen  $\beta$ -Faltblatt (1-3) aufgebaut, das von vier  $\alpha$ -Helices (A, C-E) umgeben ist. Die C-terminalen Bereiche der Stränge des Faltblattes sind Teil des aktiven Zentrums des Enzyms. Analog zu EcTop I und EcTop III befindet sich das aktive Zentrum im Kontaktbereich der Domänen I und III. Ein langer Loop (Aminosäurereste 37-62), der Strang 2 des  $\beta$ -Faltblattes mit Helix C verbindet, ragt aus Domäne I heraus und ist in der Struktur unterhalb von Domäne III lokalisiert (Abb. 3.12a).

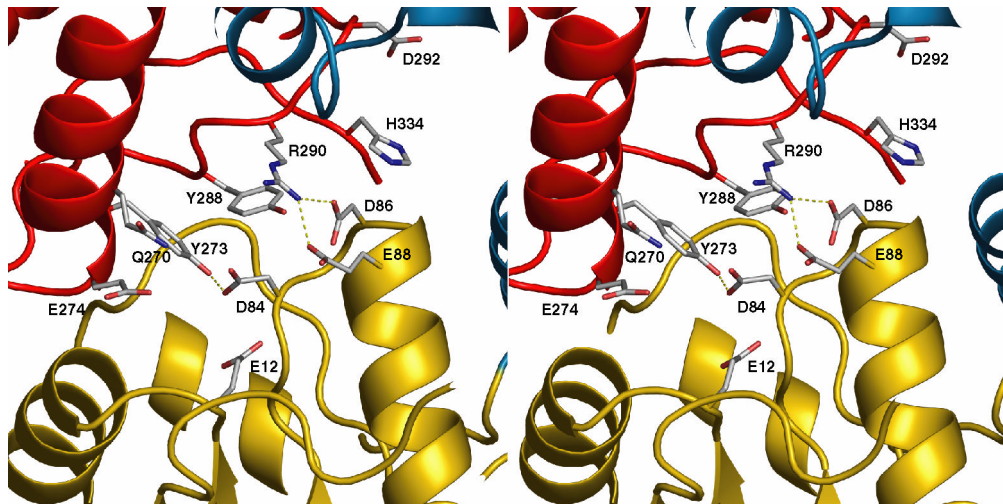
Domäne II (Aminosäurereste 186-239 und 376-443) formt eine lange, bogenförmige Verbindung zwischen den globulären Domänen III und IV (Abbildung 3.12a). Diese Domäne enthält eine kleine  $\beta$ -barrel-Struktur, die von zwei dreisträngigen  $\beta$ -Faltblättern (5, 6, 12 und 8, 9, 10) gebildet wird. Zwischen den Faltblättern 6 und 8 befindet sich eine  $\alpha$ -Helix (H). Im Vergleich zu bekannten Strukturen anderer Topoisomerasen ist Helix H in TmTop I deutlich verkürzt. Sie besteht hier lediglich aus 8 Aminosäuren gegenüber 13 Aminosäuren in EcTop I und EcTop III. Im Vergleich zu EcTop I und EcTop III ist Helix H in TmTop I senkrecht zur Helixachse um 27°C gedreht. Im Gegensatz zu TmTop I und EcTop I enthält EcTop III einen Loop (EcTop III Aminosäurereste 241-244), der in die zentrale Öffnung der Struktur hinein ragt. Dieser Loop fehlt in beiden Topoisomerasen I. Es wurde vermutet, dass dieser Loop in EcTop III an der effizienten Dekatenierung von DNA-Molekülen beteiligt ist (Mondragon und DiGate, 1999).

Die globuläre Domäne III (Aminosäuren 240 - 375) wird von fünf  $\alpha$ -Helices gebildet (I, J, K, K', L). Die Faltung dieser Domäne ist ein gemeinsames Merkmal von Typ IA, IIA und IIB Topoisomerasen, wurde aber auch in einer Anzahl anderer DNA-bindender Proteine gefunden, beispielsweise im *catabolite activator protein* aus *E. coli* (CAP; Corbett und Berger, 2004). Dieser Faltungstyp wird als 5Y-CAP-Domäne bezeichnet, da die Region das katalytische Tyrosin enthält, welches bei Typ IA Topoisomerasen eine kovalente Verbindung zum 5'-Ende der gespaltenen DNA eingeht. Die Struktur zeigt TmTop I in der geschlossenen Konformation, die durch einen engen Kontakt der Domänen I und III gekennzeichnet ist. Aminosäurereste beider Domänen sind gemeinsam am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligt. In der geschlossenen Konformation ist das aktive Zentrum unzugänglich für DNA-Substratmoleküle. Vergleiche mit Strukturen der EcTop I und EcTop III zeigen, dass viele Aminosäuren im aktiven Zentrum konserviert sind. Das aktive Zentrum wird von den Aminosäuren Gln270, Tyr273, Glu274, Arg290, Asp292 und His334 der Domäne III und den

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Aminosäuren Glu12, Asp84, Asp86 und Glu88 der Domäne I gebildet. Diese Reste sind um das katalytisch aktive Tyr288 angeordnet (Abb. 3.13). Die Aminosäuren sind an einem Wasserstoffbrücken-Netzwerk beteiligt, das unter anderem auch Interaktionen zwischen den Domänen I und III vermittelt.



**Abb. 3.13:** Stereodarstellung des aktiven Zentrums der TmTop I. Das Protein ist als Schleifendiagramm, Aminosäureseitenketten sind als Stabmodell dargestellt. Das verwendete Farbschema entspricht Abb. 3.12. Das aktive Zentrum befindet sich im Kontaktbereich der Domänen I und III. In der geschlossenen Konformation wird die Interaktion der Domänen hauptsächlich über Wasserstoffbrücken vermittelt (gestrichelte Linien). Die Aminosäuren Asp84, Asp86 und Glu88 bilden eine mögliche Magnesium-Bindestelle in der offenen Konformation des Enzyms.

Wasserstoffbrücken, die Domänen I und III miteinander verbinden, werden zwischen Seitenketten der Aminosäuren Asp86/Arg290, Glu88/Arg290 und Asp84/Tyr288 ausgebildet. In Abbildung 3.13 sind nur diese direkten Interaktionen zwischen den beiden Domänen gekennzeichnet. Zusätzlich werden eine Reihe von Wasserstoffbrücken über Wassermoleküle im aktiven Zentrum der Struktur vermittelt. Es ist anzunehmen, dass die intensiven Kontakte der Domänen I und III die geschlossene Konformation des Moleküls stabilisieren.

Das aktuelle Modell zum Reaktionsmechanismus geht von drastischen konformationellen Veränderungen der Struktur des Enzyms aus (Brown und Cozzarelli, 1981; Champoux, 1990; Tse und Wang, 1980). Es ist anzunehmen, dass sich die Form des aktiven Zentrums während der katalytischen Reaktion mehrfach ändert. Biochemische Experimente zeigten, dass die sauren Aminosäurereste des aktiven

Zentrums Asp84, Asp86 und Glu88 an der Bindung von Magnesium-Ionen beteiligt sein könnten (Lima et al., 1994; Zhu et al., 1997). Der Austausch äquivalenter Reste in EcTop I (Asp111, Asp113, Gu115) führte zu einer Veränderung der Fähigkeit des Enzyms, Magnesium zu binden (Zhu und Tse-Dinh, 2000). Die Aminosäurereste Asp84, Asp86 und Glu88 sind in der geschlossenen Konformation der TmTop I nicht in Position, Magnesium-Ionen zu koordinieren. Wie für EcTop I postuliert (Lima et al., 1994), könnten die Konformationsänderungen während der katalytischen Reaktion von TmTop I allerdings leicht zur Bildung einer Magnesiumbindestelle führen, die Ähnlichkeit mit der Magnesiumbindestelle im aktiven Zentrum der Exonuklease (Klenow-Fragment) aufweist (Beese und Steitz, 1991).

Der außerhalb des aktiven Zentrums positionierte Oberflächenloop (Aminosäurereste 319-332), der die Helices K und K' miteinander verbindet, ist in der TmTop I-Struktur nicht durch Elektronendichte definiert. Die Region wurde deshalb nicht ins Strukturmodell eingefügt. Der Loop beherbergt eine bevorzugte Proteaseschnittstelle (Aminosäuren 326-330; Viard et al., 2004). Auch die Struktur der EcTop I weist in dieser Region einen flexiblen Bereich auf, der nicht strukturell definiert ist. Es ist daher wahrscheinlich, dass der Loop in beiden Enzymen eine exponierte, zum Medium hin ausgerichtete Position einnimmt.

Ein wichtiger Unterschied zwischen TmTop I und EcTop I findet sich in der Nähe des aktiven Zentrums. Sequenzvergleiche zeigten, dass TmTop I eine Insertion von acht Aminosäuren Länge (276-283) zwischen den Helices J und K' aufweist. Die Struktur der TmTop I zeigt, dass diese Insertion einen Loop bildet, der in der geschlossenen Konformation des Enzyms vom Protein weg, Richtung Medium orientiert ist. Die Konformation des Loops wird durch Wasserstoffbrücken zwischen den Hauptkettenatomen der Aminosäuren Val276/Ile283 und Thr278/Gly281 stabilisiert. Aufgrund seiner Orientierung ist es unwahrscheinlich, dass der Loop an der katalytischen Reaktion vor der Spaltung oder nach der Religation des DNA-Einzelstranges beteiligt ist. Die Position im Kontaktbereich der Domänen I und III ermöglicht es allerdings, dass der Loop eine katalytische Funktion während der offenen Konformation des Enzyms erhält. Eine direkte Rolle des Loops im Reaktionszyklus der TmTop I kann aus den vorhandenen strukturellen Daten allein allerdings nicht abgeleitet werden. Weitere biochemische Analysen sind notwendig, um eine Funktion des Loops bei der TmTop I katalysierten Entspiralisierung der DNA zu belegen.

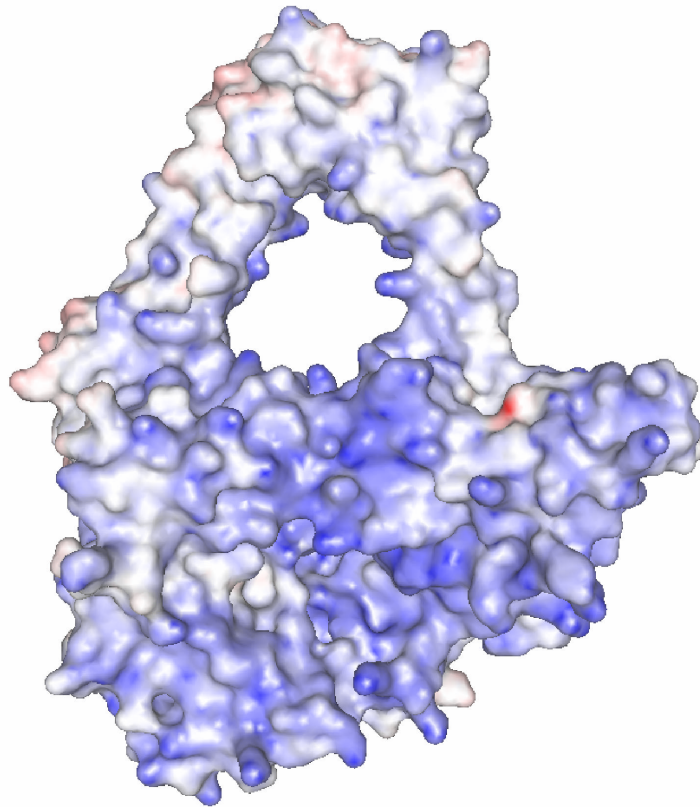
Domäne IV (Aminosäuren 130-185 und 444-542) besteht aus vier langen  $\alpha$ -Helices (F, G, Q, R), die die strukturelle Basis der Domäne bilden. Drei kürzere Helices (N, O, P)

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

und ein kurzes zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt sind um diese Basis herum angeordnet (Abb. 3.13). Ein Loop (Aminosäuren 156-165), der in der Struktur der TmTop I die Helices F und G miteinander verbindet, weist aufgrund einer etwas schwächeren Elektronendichte in diesem Bereich wahrscheinlich eine gewisse Flexibilität auf. Ein weiteres Element, das in Zusammenhang mit der hohen Dekatenierungsaktivität von EcTop III gebracht wird, ist der sogenannte „Dekatenierungsloop“ (EcTop III Aminosäuren 502-519; Mondragon und DiGate, 1999). Dieses Element befindet sich in der unteren Region der zentralen Öffnung des Proteins. Durch eine Deletion des Loops verliert EcTop III die Fähigkeit, DNA effizient zu dekatenerieren (Li et al., 2000). Obwohl auch für TmTop I eine hohe Dekatenierungsaktivität nachgewiesen wurde (Viard et al., 2001), zeigt die Struktur, dass TmTop I beide strukturellen Elemente fehlen, die in Zusammenhang mit effizienter DNA-Dekatenierung in EcTop III gebracht werden. Sowohl die Loopregion in Domäne II (EcTop III Aminosäurereste 241-244) als auch der „Dekatenierungsloop in Domäne IV (EcTop III Aminosäuren 502-519) fehlen in TmTop I. Das Enzym muss somit andere Möglichkeiten besitzen, auch ohne diese in EcTop III identifizierten strukturellen Elemente Dekatenierungsreaktionen effizient zu katalysieren.

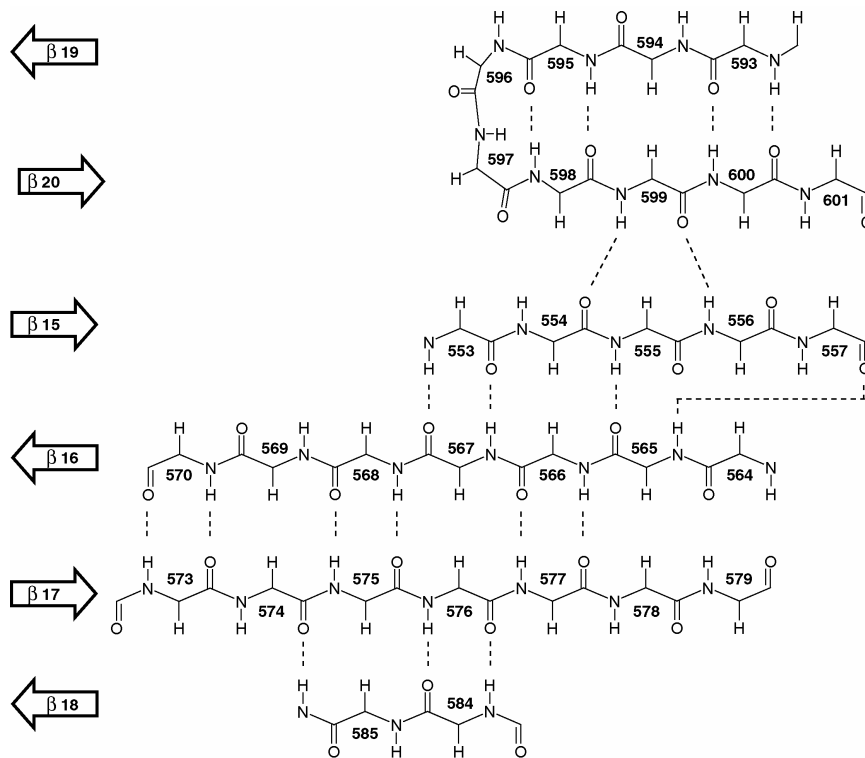
Die Domänen I-IV der TmTop I bilden gemeinsam eine Struktur, die in ihrer zentralen Öffnung einzel- oder doppelsträngige DNA aufnehmen kann. Um eine transiente Bindung des Substrates während der Reaktion zu ermöglichen, müssen die Interaktionen zwischen der DNA und Aminosäureresten an der inneren Oberfläche der Öffnung unspezifisch und relativ schwach sein. TmTop I besitzt in diesem Bereich 14 positiv geladene Aminosäurereste, deren Seitenketten in Richtung zentraler Öffnung orientiert sind. Die Berechnung einer elektrostatischen Oberfläche des Moleküls (Abb. 3.14) zeigt positiv geladene Bereiche, die über die gesamte innere Oberfläche der Öffnung verteilt sind. Diese Bereiche sind ideal, um mit dem stark negativ geladenen Phosphodiesterückrad eines DNA-Moleküls zu interagieren.



**Abb. 3.14:** Molekulare Oberfläche von TmTop I. Die Färbung der Oberfläche stellt das elektrostatische Potential des Enzyms dar. Negativ geladene Oberflächenbereiche sind rot, positiv geladene blau dargestellt. Es wurde eine Konturierung von  $\pm 15 k_B T/e$  verwendet, mit  $k_B T$  gleich dem Produkt von Boltzmannkonstante und Temperatur und  $e$  der Ladung eines Elektrons.

Die C-terminale Domäne V (Aminosäuren 543-601) befindet sich in der TmTop I-Struktur in direkter Nachbarschaft zu Domäne IV. Domäne V ist von Domäne IV weg Richtung Medium orientiert und besitzt keinerlei Kontakte zu anderen Bereichen des Proteins. Ein Loop von 10 Aminosäuren Länge (Aminosäuren 543-552) verbindet die Helix R der Domäne IV mit einem viersträngigen antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt (15-18), dem Hauptstrukturelement von Domäne V. Das viersträngige  $\beta$ -Faltblatt besteht aus den Strängen 15 (Aminosäuren 553-558), 16 (Aminosäuren 564-570), 17 (Aminosäuren 573-577) und 18 (Aminosäuren 584-585). Abbildung 3.15 zeigt ein detailliertes Schema der Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Strängen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion



**Abb. 3.15:** Organisation der  $\beta$ -Faltblätter in Domäne V. Gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrücken. Das viersträngige, antiparallele  $\beta$ -Faltblatt (15-18) bildet die zentrale Struktur des Zink-Bindemotivs. Die Stränge 19 und 20 bilden ein kurzes, antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, das mit dem Zink-Bindemotiv über zwei Wasserstoffbrücken verbunden ist.

Die Stränge 15/16 und 17/18 sind durch zwei Loops (Aminosäuren 559-563 und 578-583) miteinander verbunden. Jeder dieser Loops enthält zwei Cysteine, die zwei Cys-X-Cys-Motive bilden. Ein  $\beta$ -turn-Motiv, das durch Wasserstoffbrücken zwischen Amid- und Carbonylgruppen der Reste Gly570 und Gly573 stabilisiert wird, verbindet die Stränge 16 und 17. Diese Strukturelemente bilden zusammen ein Cys-X-Cys-X<sub>16</sub>-Cys-X-Cys-Zinkfinger-Motiv, dessen Gesamtstruktur anderen bekannten Zinkfinger-Motiven entspricht (Details siehe unten).

An Strang 18 des viersträngigen  $\beta$ -Faltblattes schließt sich ein Loop (Aminosäuren 586-592) an, der die Polypeptidkette wieder zurück Richtung Domäne IV führt. Dieser Loop positioniert ein zweites, zweisträngiges  $\beta$ -Faltblatt (Aminosäuren 593-600) in die Nähe der Helices G und P der Domäne IV. Das zweite  $\beta$ -Faltblatt besteht aus den Strängen 19 (Aminosäuren 593-595) und 20 (Aminosäuren 598-600), die durch einen Typ I  $\beta$ -turn miteinander verbunden sind. Die Struktur des Faltblattes wird über vier Wasserstoffbrücken zwischen den beiden Strängen stabilisiert (Abb. 3.15). Strang 20



vermittelt zusätzlich Kontakte zum viersträngigen  $\beta$ -Faltblatt der Domäne V. Amid- und Carbonylreste der Aminosäure Ile599 interagieren über Wasserstoffbrückenbindungen mit Hauptkettenatomen der Reste Pro554 und Asn556 in Strang 16 (Abb. 3.15).

Domäne V steht in engem Kontakt zu Domäne IV. Kontaktbereiche der Domänen sind durch intensive gerichtete Interaktionen gekennzeichnet, die Salzbrücken und Wasserstoffbrücken einschließen. Zwei Salzbrücken zwischen Asp547/Lys501 und Arg185/Asp595 führen zu einer engen Verbindung von Domäne IV und V. Zusätzlich sind die Aminosäuren der Domäne V Asn588, Glu590, Ala592, und Ile594 an der Bildung von Wasserstoffbrücken mit Val490, Ile489, Pro487 und Arg181 in Domäne IV beteiligt. Aufgrund der Komplementarität der Oberflächen im Kontaktbereich von Domäne IV und V ist das zweisträngige  $\beta$ -Faltblatt fest in einer Kavität gebunden, die von den Helices G und P der Domäne IV gebildet wird. Die Kontaktoberfläche ist hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen gekennzeichnet. Mit einer Fläche von ca. 1300 Å<sup>2</sup> sind beinahe 25 % der Gesamtoberfläche der Domäne V am Kontakt mit Domäne IV beteiligt. Zusammengenommen deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass Domäne V räumlich fixiert ist und nur geringe Veränderungen der Orientierung dieser Domäne im Bezug auf die Domänen I-IV möglich sind.

Biochemische Studien mit einem verkürztem TmTop I-Protein zeigten, dass Domäne V einen entscheidenden Einfluss auf die Thermostabilität des Enzyms hat. Während das Wildtyp-Protein bei 75°C volle DNA-Relaxationsaktivität zeigte, konnte für eine verkürzte Version ohne Domäne V, keine Aktivität nachgewiesen werden (Viard et al., 2004). Weitere Untersuchungen belegten den Einfluss der C-terminalen Region auf die Thermostabilität des Enzyms (Viard et al., 2004). Der beschriebene Effekt der Domäne V auf die Thermostabilität des Enzyms kann durch die Positionierung dieser Domäne in der TmTop I-Struktur erklärt werden. Aus Helix R kommend umschließt die Polypeptidkette von Domäne V den C-terminalen Bereich von  $\alpha$ -Helix F und stabilisiert damit diesen Bereich der Struktur. Der enge Kontakt des zweisträngigen  $\beta$ -Faltblattes (19, 20) der Domäne V und Domäne IV führt zu einer Abschirmung von hydrophoben Resten auf der Proteinoberfläche. Neben einer ausgezeichneten Oberflächenkomplementarität wird die Interaktion der Domänen durch Salzbrücken und Wasserstoffbrücken stabilisiert. Vermutlich führen die beobachteten Interaktionen zusammengenommen zu einer signifikanten Erhöhung der Thermostabilität des Enzyms.

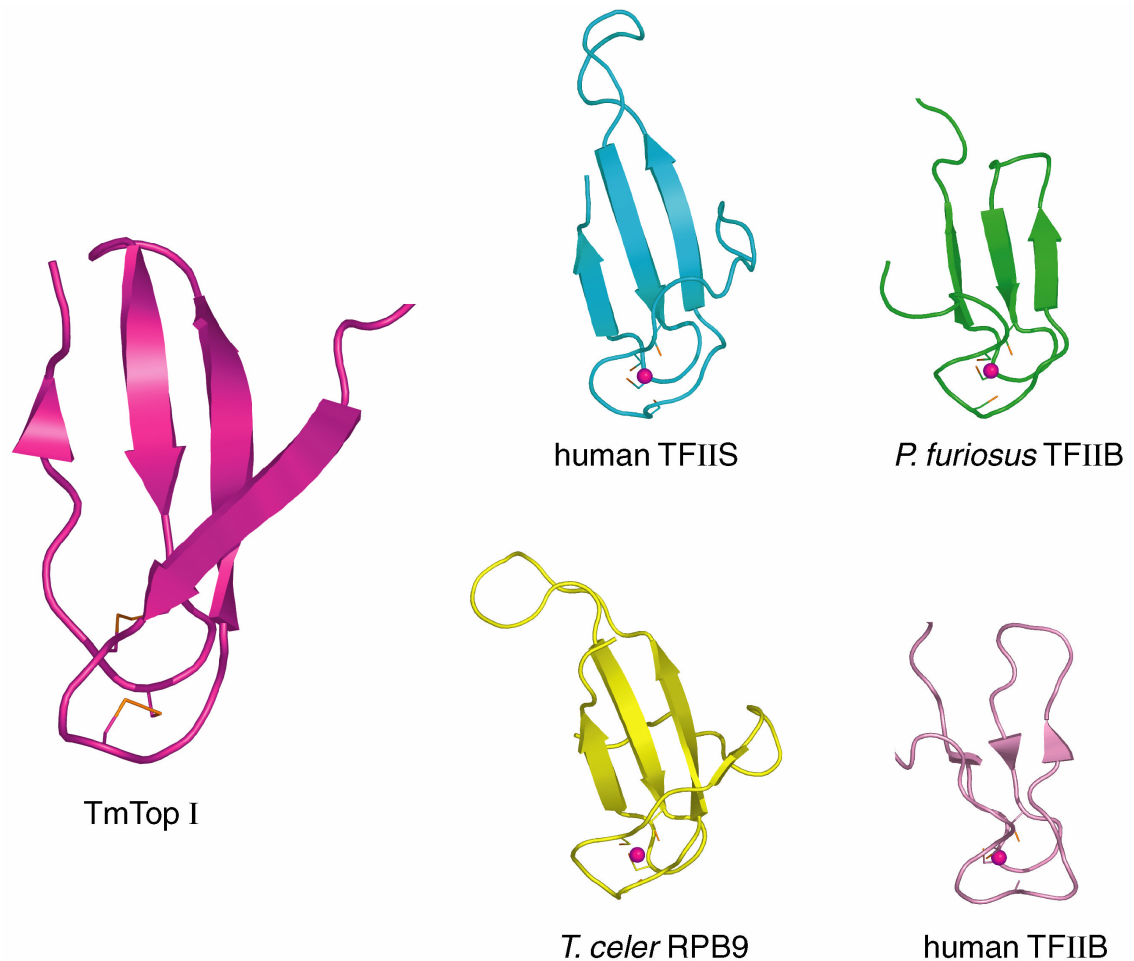
### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

#### 3.1.10 Struktur des Zink-Bindemotivs in Domäne V

Das viersträngige  $\beta$ -Faltblatt der Domäne V (Aminosäuren 553-585) bildet ein Zink-Bindemotiv, das in der Literatur als *zinc ribbon* bezeichnet wird (Qian et al., 1993a). Entsprechend der Nomenklatur von *zinc ribbons* wird der Loop zwischen den Strängen 15 und 16 in TmTop I im folgenden als primäre Haarnadelschleife (engl. *primary hairpin*) und der Loop zwischen den Strängen 17 und 18 als sekundäre Haarnadelschleife (engl. *secondary hairpin*) bezeichnet. Bei typischen *zinc ribbon*-Motiven enthalten diese Haarnadelschleifen die Sequenz CPXCG, die auch als *zinc knuckle* bezeichnet wird. Wie schon bei anderen Mitgliedern der *zinc ribbon*-Familie beobachtet, ist die Konsensussequenz der *zinc knuckles* in TmTop I nicht vollständig konserviert (Krishna et al., 2003). Entsprechend weichen die Aminosäuresequenzen in der primären und sekundären Haarnadelschleife CSCG bzw. CECG in TmTop I von der Konsensussequenz ab. Beide Haarnadelschleifen werden durch interne Wasserstoffbrücken stabilisiert. In der primären Haarnadelschleife bilden Carbonyl- und Amidgruppen von Cys559 Wasserstoffbrücken mit der Carbonylgruppe von Lys563 und der Amidgruppe von Gly562. In den meisten kristallographisch unabhängigen Molekülen wird eine weitere Wasserstoffbrücke in der sekundären Haarnadelschleife zwischen der Carbonylgruppe des Cys578 und der Amidgruppe von Cys580 oder Gly581 gebildet, die zur Stabilisierung der Struktur beiträgt.

Die *zinc ribbon*-Faltung in Domäne V wird eindeutig durch niedrige RMS-Abweichungen für C $\alpha$ -Atome von 1.3 Å (humanes TFIIB; Chen et al., 2000) bis 1.8 Å (humanes TFIIS; Qian et al., 1993b) mit den wichtigsten Vertretern der *zinc ribbon*-Familie belegt (Abbildung 3.17). Ähnliche *zinc ribbons* finden sich in verschiedenen Transkriptionsfaktoren aus Archebakterien, Eubakterien und Eukaryoten. Neben den humanen Transkriptionsfaktoren TFIIB und TFIIS gehören auch die Transkriptionsfaktor TFIIB aus *Pyrococcus furiosus* (Zhu et al., 1996) und die RNA Polymerase II Untereinheit 9 (Wang et al., 1998) zur *zinc ribbon*-Familie (Abbildung 3.16; Krishna et al., 2002).



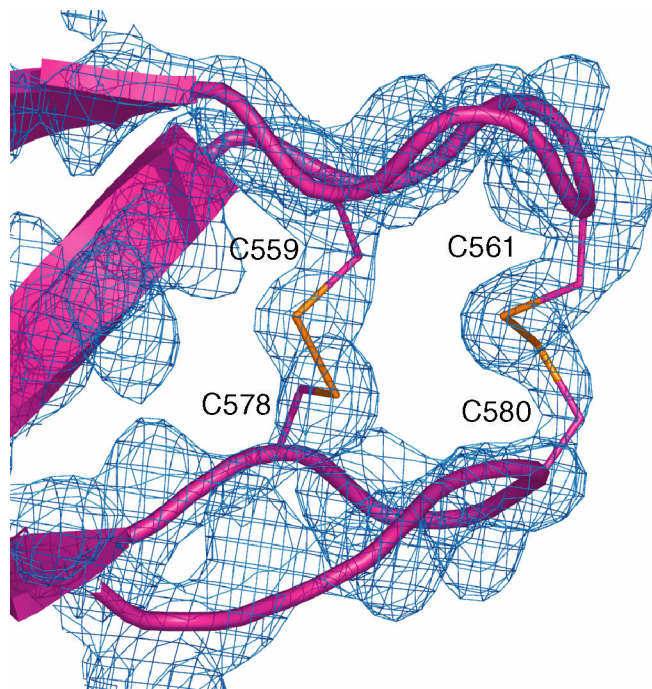
**Abb. 3.16:** Darstellung typischer *zinc ribbon*-Motive aus fünf unterschiedlichen Proteinen. TmTop I (violett, vorliegende Arbeit), humanes TFIIS (türkis, Qian et al., 1993a), *P. furiosus* TFIIB, (grün, Zhu et al., 1996), *T. celer* RPB9 (gelb, Wang et al., 1998) und humanes TFIIB (rosa, Chen et al., 2000). Proteinhauptketten sind als Schleifendiagramm, Seitenketten von Zink-koordinierenden Cysteinen als Stabmodell dargestellt. Schwefelatome sind orange gefärbt, die Positionen der Zink-Ionen sind durch violette Kugeln gekennzeichnet.

Biochemische Studien und absorptionspektrometrische Untersuchungen zeigten, dass pro TmTop I-Molekül ein Zink-Ion gebunden ist (Viard et al., 2001). Der Austausch von Cysteinen der primären Haarnadelschleife gegen Alanin sowie die Deletion der gesamten C-terminalen Region von TmTop I führt zu einem Verlust der Zink-Ionen (Viard et al. 2004; Viard et al., 2001). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen eindeutig, dass die Zink-Bindestelle der C-terminalen Domäne V ein einzelnes Zink-Ion koordiniert. Überraschenderweise bilden die Cysteine der primären Haarnadelschleife in der Kristallstruktur der TmTop I Disulfidbrücken mit Cysteinen der sekundären Haarnadelschleife. Die Entfernung zwischen den Schwefelatomen von etwa 2 Å

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

entspricht der typischen Länge einer Disulfidbindung. In keinem der kristallographisch unabhängigen Moleküle der triklinen oder monoklinen Raumgruppen der TmTop I zeigten  $|F_o - F_c|$ - und  $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichtekarten Maxima in der Umgebung des Zink-Bindemotivs, die auf gebundene Zink-Ionen hinwiesen. Um die Konformation der Seitenketten im Modell zu überprüfen, wurden *simulated annealing omit*-Elektronendichtekarten der Region berechnet. Bei diesen Rechnungen wurden die Cysteine des *zinc ribbon*-Motivs und alle Atome in einem Radius von 5 Å um diese Cysteine aus dem Modell entfernt. Die resultierenden Elektronendichtekarten bestätigten die Position der Proteinseitenketten und zeigten deutlich die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen Cys559 und Cys578 sowie zwischen Cys561 und Cys580 (Abb. 3.17).



**Abb. 3.17:** Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des *zinc ribbon*-Motivs in Domäne V. Die gegenüberliegenden Cysteine 559/578 und 561/580 in primären und sekundären Haarnadelschleifen bilden Disulfidbrücken mit einem Abstand der Sulfelatome von 2 Å. Die Proteinhauptkette (Schleifenmodell) und die Cystein-Seitenketten (Stabmodell) sind violett dargestellt, Schwefelatome sind orange gefärbt. Eine bei  $1\sigma$  konturierte  $2|F_o - F_c|$  *simulated annealing omit*-Elektronendichte (blau) bestätigt die Position der Cystein-Seitenketten des Modells.

Als zusätzliche Kontrolle wurde eine anomale Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte basierend auf dem anomalen Datensatz der monoklinen Kristallform der TmTop I berechnet. Die Wellenlänge von 1.2815 Å bei der dieser Datensatz gemessen wurde, ermöglicht die Nutzung des anomalen Streubeitrags von Zink. Das Röntgenabsorptionsspektrum, das vor der Messung zur Ermittlung der exakten Wellenlänge, am Synchrotron aufgenommen wurde (Abb. 3.9), zeigt ein klares Absorptionsmaximum, das in der Nähe des theoretischen Wertes für Zink liegt (1.2837 Å; Brennan und Cowan, 1992). Eine unter Verwendung der Phasen des verfeinerten Strukturmodells der TmTop I berechnete Differenz-Fourier-Elektronendichtekarte zeigte kein signifikantes anomales Differenzmaximum in der asymmetrischen Einheit des Kristalls. Die Ergebnisse zeigen somit eindeutig, dass die Cysteine im Zink-Bindemotiv der TmTop I-Kristalle kein Zink-Ion koordinieren.

In der Literatur ist belegt, dass Zinkfinger-Motive sehr empfindlich gegenüber Oxidations- und Reduktionsprozessen sind (Baldwin und Benz, 2002; Maret, 2002). Die Oxidation von Cysteinen in Zink-Bindemotiven und der dadurch bedingte Verlust von Zink-Ionen ist bei verschiedenen Proteinen beobachtet worden (DNA-Primase, Griep und Lokey, 1996; Ribonukleotid-Reduktase, Padovani et al., 2001; Anti-Sigma-Faktor RsrA, Paget et al., 2001; *heat shock protein 33*, Aslund und Beckwith, 1999; Jakob et al., 1999). Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse kann die Bildung von Disulfidbrücken im Zink-Bindemotiv der TmTop I durch die Oxidation von Thiol-Gruppen der Cysteine durch Luftsauerstoff erklärt werden. Dies ist wahrscheinlich, wenn man die große Empfindlichkeit der Zinkfinger-Motive gegenüber Oxidationsprozessen im allgemeinen und das Fehlen eines Reduktionsmittels während der langen Kristallisationsphase des Proteins im speziellen berücksichtigt. Bemerkenswert ist, dass die Proteinpräparation, die von Viard et al. (2001) zur Bestimmung des Zink-Gehaltes der TmTop I verwendet wurde, ebenfalls kein Reduktionsmittel oder zusätzliche Zink-Ionen enthielt. Die Zusammensetzung war vergleichbar mit der in der vorliegenden Arbeit zur Kristallisation verwendeten Proteinprobe. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die Cysteine während der langen Kristallisationsphase durch Luftsauerstoff oxidiert wurden und das Protein so gebundene Zink-Ionen verlor. Freie Zink-Ionen im Kristall und in der Mutterlauge könnten für das gemessene Röntgenfluoreszenzsignal verantwortlich sein.

In vielen Proteinen, die Zink-Bindemotive enthalten, haben die Zink-Ionen die Aufgabe die strukturelle Integrität des Motivs zu stabilisieren (Krishna et al., 2003). In kleinen mitochondrialen TIM-Proteinen (engl. *translocase of inner membrane*) koordinieren zwei konservierte C-X<sub>3</sub>-C-Motive ein Zink-Ion (Koehler et al., 1999; Lutz et al., 2003).

### 3 Ergebnisse und Diskussion

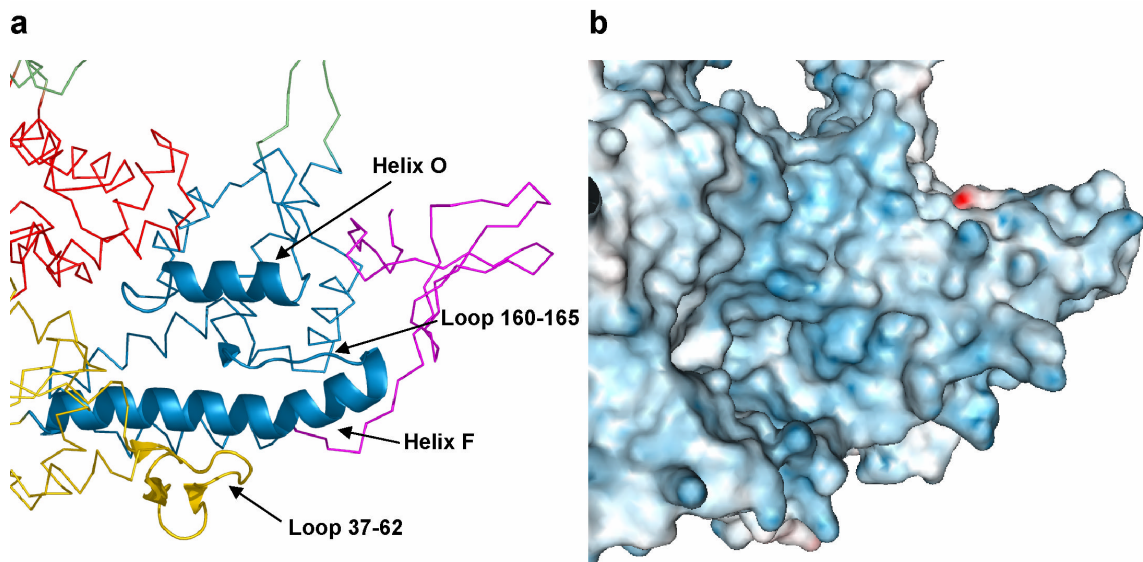
---

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass sowohl endogene als auch rekombinante TIM-Proteine in ihrer aktiven Form Disulfidbrücken zwischen gegenüberliegenden Cysteinen zweier C-X<sub>3</sub>-C-Motive ausbilden können (Curran et al., 2002a; Curran et al., 2002b). Dem aktuellen Modell zufolge kann die Struktur kleiner TIM-Proteine entweder durch die Bildung von Disulfidbrücken oder die Koordination eines Zink-Ions stabilisiert werden (Koehler, 2004). Eine ähnliche Situation ist im Bezug auf die Zink-Bindedomäne der TmTop I denkbar. Obwohl in der Kristallstruktur ein Zink-Ion fehlt, bleibt die Faltung der *zinc ribbon*-Domäne des Proteins erhalten. Dieses Ergebnis wird klar durch die berechneten geringen RMS-Abweichungen zwischen TmTop I und *zinc ribbon*-Domänen mit gebundenen Zink-Ionen belegt (Abb. 3.16). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die identifizierte Faltung der Domäne V auch der funktionellen Struktur dieser Domäne innerhalb der Zelle entspricht. In der natürlichen Umgebung des Proteins wird wahrscheinlich ein Zink-Ion von Domäne V koordiniert. Die in der Röntgenstruktur beobachteten Disulfidbrücken besitzen einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur der Domäne, insbesondere fixieren sie die Orientierung der Haarnadelschleifen zueinander. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Disulfidbrücken in Domäne V auch eine Rolle im natürlichen intrazellulären Umfeld der TmTop I spielen. Obwohl die reduzierenden Bedingungen des Cytosols in der Regel die Oxidation von Thiol-Gruppen verhindern sollten, sind Beispiele bekannt, in denen die Oxidation von Thiol-Resten der Zink-koordinierenden Cysteine einen regulatorischen Einfluss auf die Aktivität des Proteins hat (HSP33, Aslund und Beckwith, 1999; RsrA, Paget et al., 2001). Das Zink-Ion selbst ist nicht essentiell für die DNA-Entspiralisierungsaktivität der TmTop I (Viard et al. 2001). Es ist deshalb anzunehmen, dass der beobachtete Aktivitätsverlust des verkürzten Proteins auf die Struktur der Domäne V selbst und nicht auf den Verlust eines Zink-Ions zurückzuführen ist.

#### 3.1.11 Erweiterte DNA-Bindespalte in TmTop I

Wie die Strukturen von EcTop I und EcTop III zeigt die Struktur von TmTop I eine tiefe DNA-Bindespalte, die hauptsächlich von den Domänen I und IV gebildet wird und sich über die gesamte Basis des Enzyms erstreckt. (Abb. 3.12). Die DNA-Bindespalte wird nach oben hin von  $\alpha$ -Helix O begrenzt.  $\alpha$ -Helix F und ein benachbarter Loop (Aminosäurereste 160-165) bilden den "Boden" der Spalte. Die untere Begrenzung

wird von einem langen Loop (Aminosäurereste 37-62) der Domäne I gebildet (Abb. 3.18a).



**Abb. 3.18:** DNA-Bindespalte der TmTop I. **(a)** Modell der Proteinhauptkette im Bereich der DNA-Bindespalte. Das verwendete Farbschema entspricht Abb. 3.12. Die Spalte wird von  $\alpha$ -Helix O (obere Begrenzung), Helix F und Loop 160-165 („Boden“) und Loop 37-62 (untere Begrenzung) gebildet. Diese Elemente sind als Schleifenmodell dargestellt. **(b)** Elektrostatische Oberfläche der Region. Die Orientierung des Modells ist identisch mit (a). Die Oberflächenkonturierung entspricht Abb. 3.14.

Eine elektrostatische Oberfläche des Enzyms zeigt, dass die DNA-Bindespalte hauptsächlich positiv geladen ist (Abb. 3.18b). Neben positiv geladenen Aminosäureseitenketten ragen zwei aromatische Aminosäurereste in die Spalte hinein. Diese Aminosäureseitenketten sind so orientiert, dass eine Wechselwirkung mit dem Substrat über elektrostatische Interaktionen und  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen ermöglicht wird. Die Aminosäurereste His36, Arg141, Gln169, Arg 290, Thr464 und Arg475 könnten zusätzlich Wasserstoffbrücken mit dem Substrat ausbilden. Die meisten dieser Reste sind konserviert zwischen TmTop I, EcTop I und EcTop III und in Komplexstrukturen mit kurzen Oligonukleotiden an Interaktionen zwischen Enzym und DNA beteiligt (Changela et al., 2001; Perry und Mondragon, 2003).

Die parallel zur DNA-Bindespalte orientierte  $\alpha$ -Helix O begrenzt die Spalte nach oben hin und schafft eine Interaktionsfläche für das Substrat. In der Struktur der freien EcTop I ohne gebundenes Substrat ist diese Helix ähnlich orientiert. Im Gegensatz

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

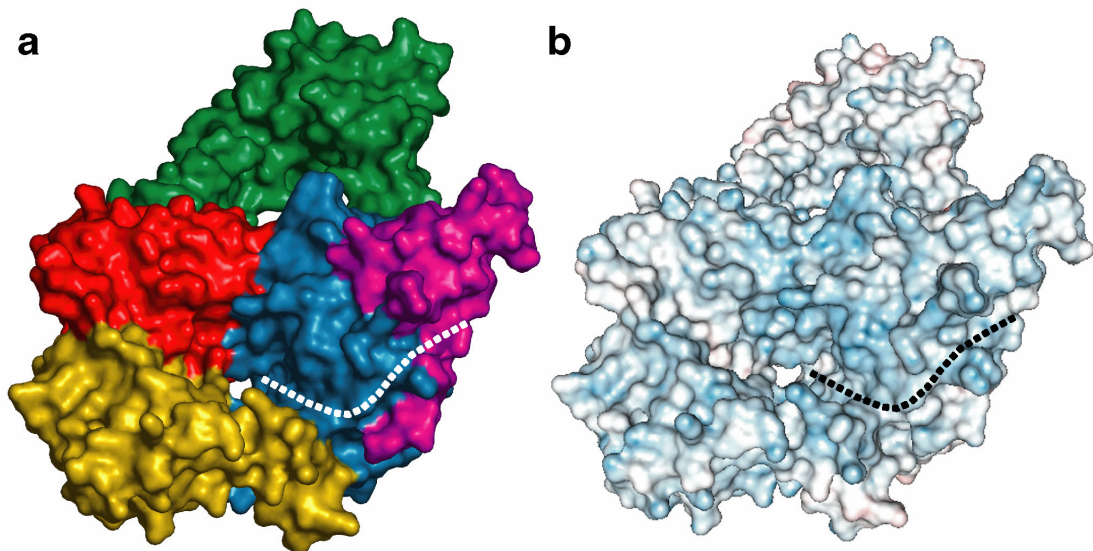
dazu nimmt Helix O in der Struktur des EcTop I-DNA-Komplexes zwei alternative Konformationen an, die beide von der in TmTop I beobachteten Konformation abweichen. Es wurde vermutet, dass die Konformationen von Helix O im EcTop I-DNA-Komplex unterschiedliche Stadien im Reaktionszyklus der Topoisomerase darstellen (Perry und Mondragon, 2003). Es ist anzunehmen, dass die DNA-freien Strukturen der TmTop I und der EcTop I dasselbe Stadium der enzymatischen Reaktion repräsentieren, vermutlich die Konformation des Enzyms vor der Spaltung des Substrates oder nach der Religation des gespaltenen DNA-Stranges.

Ein wichtiger Unterschied zwischen TmTop I weist die Struktur des „Bodens“ der DNA-Bindespalte auf. Einige Aminosäuren eines Loops (Aminosäurereste 160-165) in diesem Bereich sind nur schlecht durch Elektronendichte definiert. Ein Vergleich mit den sehr gut definierten Aminosäuren in der Umgebung lässt vermuten, dass dies auf eine gewisse Flexibilität des Loops hinweist. In der Struktur der TmTop I wurde dieser Loop in der wahrscheinlichsten Konformation modelliert. Beim Modellbau in dieser Region wurden sowohl die vorhandene Elektronendichteverteilung als auch stereochemische Parameter der Proteinkette berücksichtigt. Anders als in EcTop I und EcTop III beobachtet, ragt der Loop in die DNA-Bindespalte hinein. Es kommt so zwar nicht zu einem völligen Verschluss der Bindestelle, die Modellierung der kokristallisierten einzelsträngigen DNA aus EcTop I und EcTop III in die Bindespalte von TmTop I zeigte aber, dass deutliche sterische Hinderungen zwischen DNA und Protein auftreten. Es ist deshalb anzunehmen, dass die Substratbindung in TmTop I zu signifikanten strukturellen Veränderungen des Enzyms führt, insbesondere im Bereich der DNA-Bindespalte. Diese Sichtweise wird weiter durch die Beobachtung unterstützt, dass auch die untere Begrenzung der DNA-Bindespalte flexible Bereiche aufweist. Dieser Teil der Struktur wird von einem Loop (Aminosäurereste 37-62) der Domäne I dominiert. Kristallographisch unabhängige Moleküle der TmTop I zeigen unterschiedliche Konformationen mit jeweils eindeutigen Elektronendichten für einen Bereich des Loops, der von den Aminosäuren 41 – 45 gebildet wird. Struktur und Sequenz dieses Loops sind nicht konserviert zwischen TmTop I und EcTop I und EcTop III. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass dieser Bereich der DNA-Bindespalte der TmTop I eine höhere Flexibilität aufweist, als strukturelle Daten homologer *E. coli*-Enzyme vermuten lassen. Es ist anzunehmen, dass die Substratbindung in TmTop I zu signifikanten strukturellen Veränderungen im Bereich der DNA-Bindespalte führt.

Das *zinc ribbon*-Motiv der Domäne V befindet sich in direkter räumlicher Nachbarschaft zur DNA-Bindespalte. Die beschriebenen Funktionen von *zinc ribbon*-Motiven sind



vielfältig und scheinen sehr stark von der Proteinumgebung abzuhängen. Neben Interaktionen von *zinc ribbon*-Motiven mit RNA-Molekülen (Hard et al., 2000; Harms et al., 2001; Klein et al., 2001) sind in der Literatur *zinc ribbon*-vermittelte Protein-Protein-Wechselwirkungen (Archer et al., 1995; Macol et al., 2001; Min et al., 2001) und Interaktionen mit DNA-Molekülen beschrieben (Agarwal et al., 1991; Qian et al., 1993b). Die Rolle von *zinc ribbon*-Domänen bei DNA-Topoisomerasen ist unklar. Die Position der Domäne V in der TmTop I-Struktur deutet allerdings auf eine Beteiligung des *zinc ribbon*-Motivs bei der Substratbindung hin. Mit Hilfe der gewonnenen Strukturinformationen über die Domäne V selbst und ihrer Orientierung zum Rest des Proteins lässt sich ein Modell für die DNA-Interaktion der Topoisomerase ableiten, mit dessen Hilfe viele biochemische Ergebnisse erklärt werden können (Abb. 3.19).



**Abb. 3.19:** Modell für die Bindung von einzelsträngiger DNA durch TmTop I. Die gestrichelte Linie markiert eine mögliche verlängerte DNA-Interaktionsoberfläche für einzelsträngige DNA. Die DNA bindet in die Spalte in der Nähe des aktiven Zentrums, besetzt die Spalte an der Grenzfläche von Domäne I und IV und interagiert mit positiv geladenen Oberflächenbereichen der Domäne V. **(a)** Molekulare Oberfläche, die den DNA-Interaktionsbereich des Enzyms darstellt. Die einzelnen Domänen sind wie in Abb. 3.12 gefärbt. **(b)** Elektrostatische Oberfläche des Proteins in der gleichen Orientierung wie in (a). Die Oberflächenkonturierung entspricht Abb. 3.14.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Die Position der Domäne V in Verbindung mit biochemischen Ergebnissen lässt vermuten, dass das *zinc ribbon*-Motiv die Funktion einer verlängerten DNA-Bindestelle besitzt. Die Orientierung zu Domäne I-IV ermöglicht die Interaktion mit zusätzlichen Nukleotiden des DNA-Einzelstranges mit Domäne V. Besonders exponierte aromatische und positiv geladene Seitenketten (Trp156, Arg157, Lys160, Arg548, Arg566, Tyr575) auf der Oberfläche von Domäne V können die DNA-Bindung durch günstige  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen und elektrostatische Wechselwirkungen stabilisieren. Dieses Modell wird durch die Tatsache unterstützt, dass der C-terminale Bereich der Helix F und die Loopregion inklusive der Aminosäuren 543-552 flexibel sind. Dieser Bereich der Struktur könnte sich so bei der Substratbindung konformationell anpassen und günstige Protein-Substrat Wechselwirkungen optimieren.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine verkürzte, nur aus Domäne I-IV bestehende Version des Proteins, DNA mit sehr stark verminderter Effizienz entspiralisiert (Viard et al. 2004). Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine verminderte Bindung von einzelsträngiger DNA zurückzuführen und lässt vermuten, dass die Substratbindung der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Entspiralisierungsreaktion ist (Viard et al. 2004). Die Deletion von Domäne V hat zusätzlich einen Einfluss auf die Spaltungsspezifität des Enzyms. Untersuchungen mit einzelsträngiger DNA einer Länge von 22 Basen zeigten, dass TmTop I bevorzugt DNA-Substrate mit einem Cytosin in Position - 4 spaltet (Viard et al., 2001). Nach der Spaltung bleiben beide DNA-Fragmente fest mit dem Enzym assoziiert. Entsprechend dem katalytischen Mechanismus geht das 5' Ende des kürzeren Fragmentes (Nukleotide 18-22) eine kovalente Verbindung mit dem nucleophilen Tyrosin im aktiven Zentrum ein, während die restlichen 17 Basen (Nukleotide 1-17) nicht-kovalent gebunden in der DNA-Bindespalte verbleiben. Experimente mit radioaktiv markiertem Substrat zeigten, dass dieses Fragment selbst während einer nativen Gelelektrophorese des Komplexes mit dem Enzym assoziiert bleibt (Viard et al. 2004). Dies spricht für eine starke Interaktion von Enzym und Substrat. Nach der TmTop I-Struktur zu urteilen, bietet die DNA-Bindespalte analog zu EcTop I und EcTop III Raum für sechs bis acht Nukleotide (Changela et al., 2001; Perry und Mondragon, 2003). Die starke Interaktion des DNA-Fragmentes (Nukleotide 1-17) mit dem Enzym kann durch eine stabilisierende Interaktion der Domäne V mit Nukleotiden der Region - 7 bis - 17 der DNA in Bezug auf die Spaltungsstelle erklärt werden. Dies könnte zu einer Erhöhung der Substrataffinität des Enzyms durch zusätzliche günstige Interaktionen und dadurch bedingt zu einer erhöhten Entspiralisierungsaktivität des Enzyms führen. Experimente mit einem verkürzten TmTop I-Enzym, bestätigen diese Hypothese (Viard et al., 2004).

Der Einfluss auf die Positionierung der Spaltungsstelle der DNA kann durch gerichtete Interaktionen der Domäne mit dem Substrat erklärt werden.

Zusammengenommen sprechen viele biochemische Ergebnisse für die Interaktion von Domäne V mit dem DNA-Substrat. Mit Hilfe des auf Basis der Struktur entwickelten Modells können Effekte der Domäne V auf Substratbindung und Spaltungsspezifität erklärt werden.

#### 3.1.12 Struktur der C-terminalen Domäne anderer Topoisomerasen

Die aufgeklärte Struktur der Domänen I-V in TmTop I erlaubt einen detaillierten Blick auf die strukturelle Basis einer Topoisomerase I und deutet auf eine Rolle der Zink-Bindedomäne bei der Substratbindung hin. Obwohl die C-terminalen Regionen von Typ IA Topoisomerasen sich stark bezüglich Länge und Aminosäuresequenz unterscheiden, enthalten die meisten Proteine *zinc ribbon*-Motive in dieser Region (Caron und Wang, 1994).

Die biochemisch am besten charakterisierte Topoisomerase, EcTop I, besitzt einen langen C-terminale Bereich von 268 Aminosäuren, der drei funktionale *zinc ribbon*-Motive enthält (Tse-Dinh und Beran-Steed, 1988). Eine Analyse von Sequenz- und Strukturdaten zeigte, dass zwei zusätzliche Bereiche der C-terminalen Region wahrscheinlich ebenfalls zur *zinc ribbon*-Familie gehören (Grishin, 2000). Obwohl diese *zinc ribbon*-Motive keine typischen Zink-koordinierenden Cysteine besitzen und sie deshalb kein Zink binden können, deutet diese Arbeit auf insgesamt fünf *zinc ribbon*-Motive in EcTop I hin. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass im Gegensatz zu TmTop I ein Fehlen der C-terminalen Domäne oder das Entfernen der gebundenen Zink-Ionen zu einer vollständigen Deaktivierung des Enzyms führt (Ahumada und Tse-Dinh, 2002; Viard et al., 2004). Wie für TmTop I angenommen wird auch für EcTop I vermutet, dass die C-terminale Region dieses Enzyms an der Bindung einzelsträngiger DNA beteiligt ist (Ahumada und Tse-Dinh, 2002; Kirkegaard und Wang, 1985; Tse-Dinh, 1991; Tse-Dinh und Beran-Steed, 1988; Zhu et al., 1995).

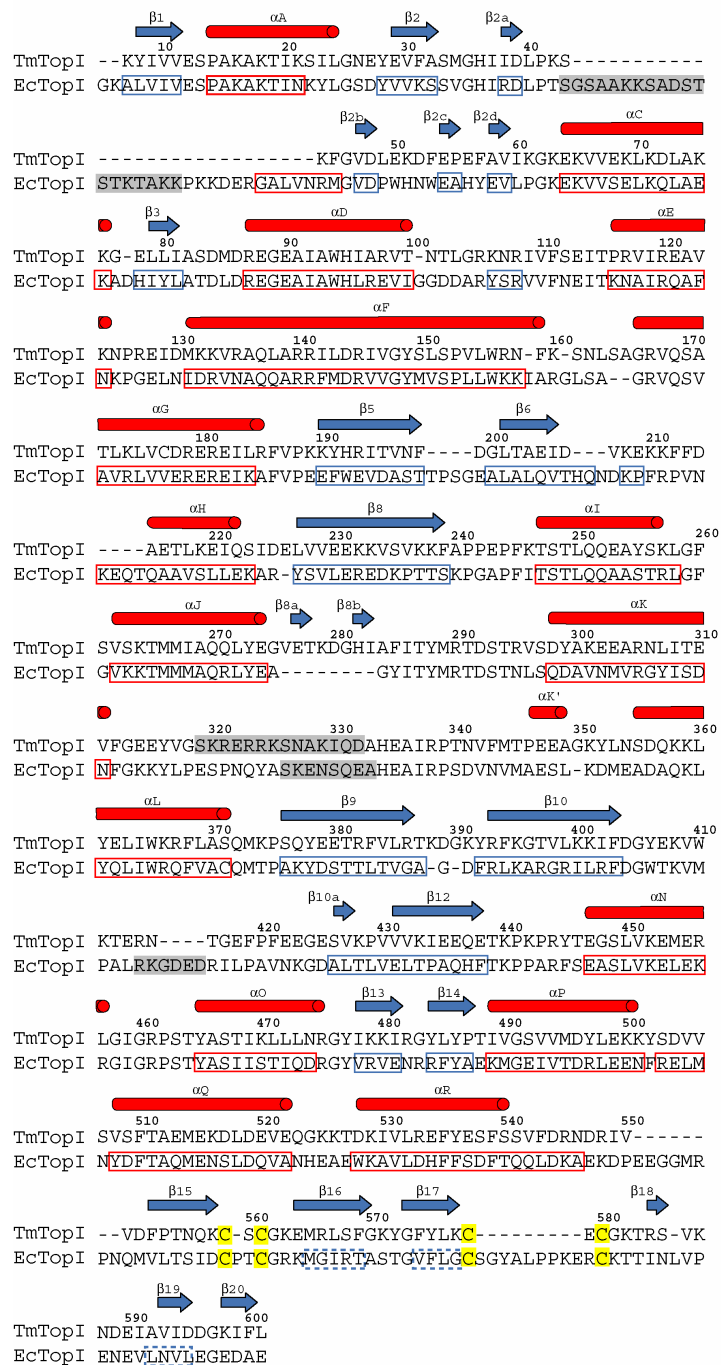
Da strukturelle Informationen fehlen, ist die Orientierung der C-terminalen Region in EcTop I in Bezug auf die Domänen I-IV unbekannt. Ein strukturbasiertes Sequenzalignment von TmTop I und EcTop I zeigt die strukturell homologen Regionen der Domänen I-IV (Abb. 3.20). Das Alignment der C-terminalen Region (TmTop I Aminosäuren 543-601) basiert auf einem multiplen Sequenzvergleich von EcTop I

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

inklusive des ersten *zinc ribbon*-Motivs (Aminosäuren 1-661) mit 90 homologen Topoisomerasen.

Das Alignment zeigt die auffallende Ähnlichkeit des *zinc ribbon*-Motivs von TmTop I mit dem ersten *zinc ribbon*-Motiv von EcTop I. Neben den Positionen der Zink-koordinierenden Cysteine selbst ist auch die Anzahl der Aminosäuren zwischen primären und sekundären Haarnadelschleifen der *zinc ribbon*-Motive konserviert. Dieser Bereich weist eine hohe Sequenzhomologie auf, von 16 Aminosäuren sind vier identisch und acht besitzen ähnliche biochemische Eigenschaften. Zwischen den Cysteinen der sekundären Haarnadelschleife ist in EcTop I eine Insertion von neun Aminosäuren lokalisiert. Das Alignment wird zusätzlich von Sekundärstrukturvorhersagen der EcTop I-Sequenz unterstützt (Abb. 3.20). Bemerkenswert ist, dass alle vorhergesagten  $\beta$ -Stränge durch das Alignment TmTop I-Sequenzen zugeordnet wurden, die auch in der TmTop I-Struktur  $\beta$ -Stränge ausbilden. Die Aminosäuren 606-610 und 615-618 des ersten *zinc ribbon*-Motivs in EcTop I bilden so wahrscheinlich  $\beta$ -Stränge, die im Sequenzalignment den  $\beta$ -Strängen 16 und 17 des Zink-Bindemotivs von TmTop I entsprechen. Interessanterweise wurde durch das Sequenzalignment auch den  $\beta$ -Strängen 19 ein EcTop I-Sequenzbereich zugeordnet, der als  $\beta$ -Strang vorhergesagt wird. EcTop I besitzt somit möglicherweise ähnlich wie TmTop I ein kurzes  $\beta$ -Faltblatt, das auf das *zinc ribbon*-Motiv folgt. Auf Grundlage dieser Ergebnisse ist daher anzunehmen, dass das erste *zinc ribbon*-Motiv und die darauf folgenden Aminosäuren in EcTop I eine mit TmTop I vergleichbare Struktur aufweisen. 14 Aminosäuren, die Helix R und  $\beta$ -Strang 18 in EcTop I verbinden, könnten ähnlich wie der Loop 543-552 in TmTop I als *spacer* fungieren und die Domänen I-IV mit der *zinc ribbon*-Domäne verbinden. Dies würde eine mit TmTop I vergleichbare Positionierung der Struktur in EcTop I ermöglichen. Da die Helices G und P der Domäne IV in EcTop I eine mit TmTop I vergleichbare Kavität bilden, ist denkbar, dass das dem *zinc ribbon*-Motiv folgende  $\beta$ -Faltblatt, wie in TmTop I beobachtet, fest mit der Domäne IV verbunden ist.



**Abb. 3.20:** Strukturbasiertes Sequenzalignment von TmTop I und EcTop I. Die Nummerierung der Aminosäuren entspricht TmTop I.  $\alpha$ -Helices (rote Zylinder) und  $\beta$ -Faltblätter (blaue Pfeile) in TmTop I sind über der Sequenz angegeben. Sekundärstrukturelemente von EcTop I sind durch rote ( $\alpha$ -Helices) und blaue ( $\beta$ -Faltblätter) Kästen markiert. Ungeordnete Regionen, die in den Proteinstrukturen nicht eindeutig definiert sind, sind grau hinterlegt. Das Alignment der C-terminalen Domäne (TmTop I Aminosäuren 543-601) basiert auf Sequenzhomologie. Zink-koordinierende Cysteine der *zinc ribbon*-Motive sind gelb hinterlegt, durch Sekundärstrukturvorhersagen prognostizierte  $\beta$ -Faltblätter in der C-terminalen Region von EcTop I sind durch gestrichelte Kästen markiert.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

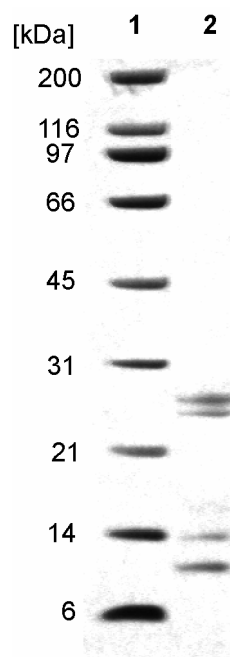
---

In Übereinstimmung mit experimentellen Ergebnissen kann für das erste *zinc ribbon*-Motiv von EcTop I eine mit TmTop I Domäne V vergleichbare Struktur postuliert werden. In einem vollständigen mechanistischen Modell der C-terminalen Domäne von EcTop I stellt der Bereich um das erste *zinc ribbon*-Motiv eine zusätzliche Oberfläche für DNA-Interaktionen mit dem zu spaltenden DNA-Strang bereit, während die restlichen Aminosäuren der C-terminalen Region mit dem intakten DNA-Strang interagieren könnten (Ahumada und Tse-Dinh, 2002). Nach Sequenzhomologien mit C-terminalen Regionen anderer Topoisomerasen zu urteilen ist es möglich, dass die in TmTop I beobachtete Interaktion der Domäne V mit der Domänen IV ein allgemeines strukturelles Organisationsmotiv von Typ IA Topoisomerasen widerspiegelt.

## 3.2 Humane neutrophile Elastase

### 3.2.1 Proteinanalytik

Humane neutrophile Elastase (HNE) wurde von der Firma Serva (Heidelberg) bezogen. Das Protein-Lyophilisat wurde in 10 mM HEPES/NaOH, pH 6.5 gelöst, um eine Endkonzentration von 10 mg/ml zu erhalten. Die Proteinlösung wurde durch SDS-Gelelektrophorese analysiert. Ein Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel zeigt eine Doppelbande bei 25 kDa (Abb. 3.21). Zusätzlich sind zwei weitere Proteinbanden mit ungefähren Molekulargewichten von 14 kDa und 9 kDa sichtbar (Abb. 3.21).



**Abb. 3.21:** SDS-Gelelektrophorese der HNE. Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel mit Material der HNE-Lösung (Spur 2) und einem Größenmarker (Spur 1).

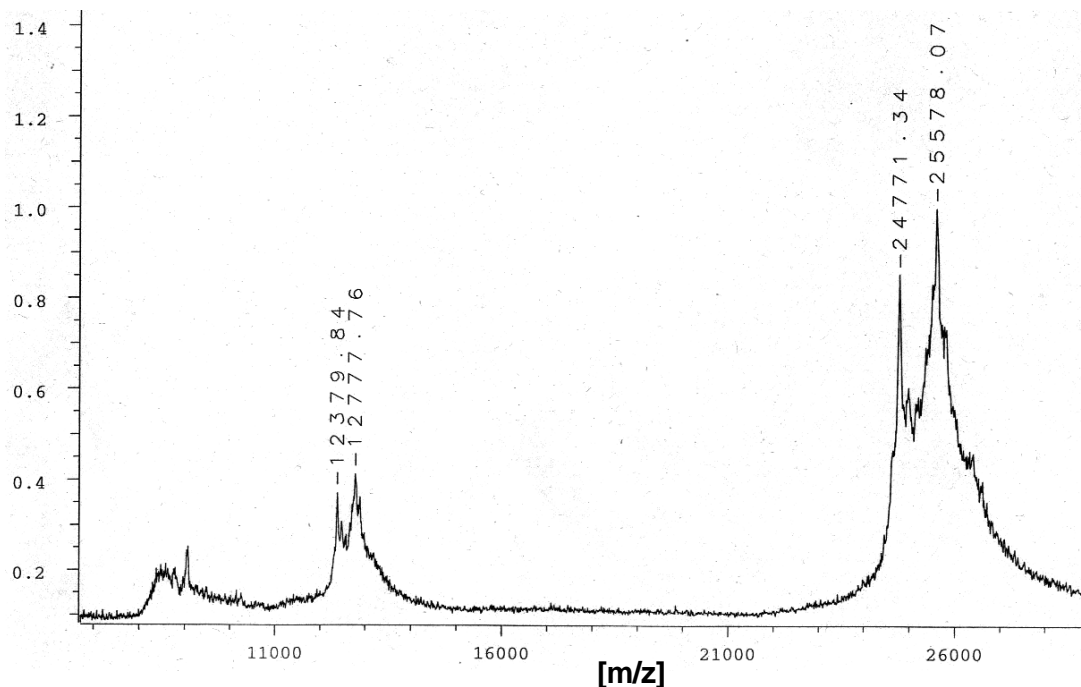
Um die Probe genauer zu untersuchen, wurden MALDI-TOF-Massenspektren angefertigt (MALDI, *matrix assisted laser desorption ionization*; TOF, *time of flight*). Massenspektren der HNE zeigten jeweils zwei Maxima für einfach und zweifach geladene HNE-Moleküle um 12 kDa und 25 kDa. Ein weiteres Maximum bei 9 kDa

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

ist auf die bereits durch SDS-Gelelektrophorese identifizierte Verunreinigung zurückzuführen (Abb. 3.22).

Die in der Probe enthaltenen Proteine wurden durch *peptide-mapping* weiter charakterisiert. Nach Trennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese wurden die einzelnen Gelbanden ausgeschnitten und proteolytisch gespalten. Durch eine massenspektrometrische Untersuchung der Peptidfragmente und einen Vergleich mit der Datenbank TrEMBL konnten die einzelnen Proteine eindeutig identifiziert werden. Die Proteinbanden bei 25 kDa enthielten ausschließlich HNE. Während das Protein mit einem Molekulargewicht von 14 kDa einem Abbauprodukt der HNE entspricht, enthielt die Proteinbande bei 9 kDa die Proteine Calgranulin A und B.



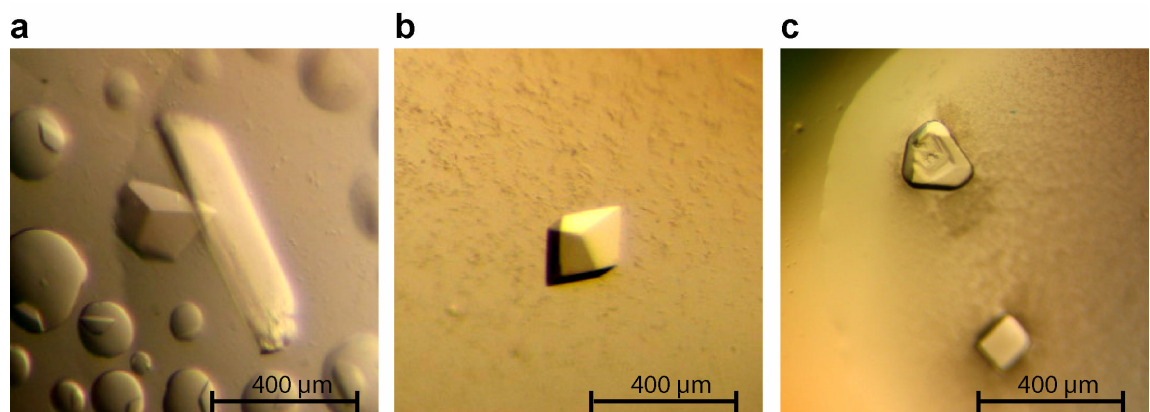
**Abb. 3.22:** MALDI-Massenspektrum der HNE. Die Maxima bei 25.548 kDa und 24.771 kDa werden durch einfach geladene, die Maxima bei 12.379 kDa und 12.777 kDa durch zweifach geladene HNE-Moleküle verursacht. Das Maximum bei 9 kDa beruht auf einer Verunreinigung der Probe mit Calgranulin A und B.

Da für Kristallisationsexperimente nur eine sehr begrenzte Menge an HNE zur Verfügung stand, wurde die Proteinlösung nicht weiter gereinigt und direkt für die Kristallisation des Proteins verwendet.



#### 3.2.2 Kristallisation der HNE

In initialen Kristallisationsexperimenten mit HNE konnten unter verschiedenen Bedingungen sowohl bei 20 °C als auch bei 4°C Kristalle des freien Proteins ohne Inhibitor beobachtet werden. Diese Kristalle bildeten sich innerhalb eines Zeitraumes von drei bis vier Wochen. Eine systematische Optimierung der Kristallisationsbedingungen führte zu Kristallen mit guten Diffraktionseigenschaften (Abb. 3.23). Die optimierten Kristallisationsbedingungen sind in Tabelle 3.12 aufgeführt. Kristalle hatten Kantenlängen von 0.2 x 0.3 x 0.8 mm (tetragonale Kristallform) und 0.2 x 0.3 x 0.3 mm (orthorhombische Kristallform). Für beide Kristallformen konnte Glycerin als geeignetes Cryoprotektant ermittelt werden. Während große Kristalle der tetragonalen Kristallform nach Zugabe von 20 % Glycerin zur Reservoirlösung entstanden, wurden Kristalle der orthorhombischen Kristallform nach der Kristallisation in eine geeignete Cryoprotektionslösung eingelegt. Die Cryoprotektionslösung bestand aus 25 % PEG 8000, 0.1 M Na-Kakodylat pH 6.5 und 15 % Glycerin.



**Abb. 3.23:** Kristalle der HNE. **(a)** Optimierte Kristalle des HNE-Apo-Enzyms der Raumgruppe  $P4_12_12$ . **(b)** Optimierter HNE-Apo-Kristall der Raumgruppe  $P2_12_12_1$ . **(c)** Kristalle des HNE-WO24700-Komplexes der Raumgruppe  $P6_3$ .

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

**Tab. 3.12:** Überblick über optimierte Kristallisationsbedingungen des HNE-Apo-Enzyms

<b>Kristallisationsbedingung</b>	<b>HNE - tetragonale Kristallform</b>
Reservoir	1.9 M Ammoniumsulfat 5 % PEG 400 (w/v) 0.1 M MES/NaOH, pH 6.5 20 % Glycerin (v/v)
Proteinkonzentration	10 mg/ml
Proteinpuffer	10 mM Hepes/NaOH, pH 6.5
Temperatur	20 °C
Tropfen	1 µl Proteinlösung + 1 µl Reservoir

<b>Kristallisationsbedingung</b>	<b>HNE - primitiv orthorhombische Kristallform</b>
Reservoir	20 % PEG 8000 0.1 M Na-Kakodylat, pH 6.5 0.2 M Zn <sup>2+</sup> -Acetat
Proteinkonzentration	10 mg/ml
Proteinpuffer	10 mM Hepes/NaOH, pH 6.5
Temperatur	20 °C
Tropfen	1 µl Proteinlösung + 1 µl Reservoir

Zur Herstellung von Komplexen der HNE mit dem peptischen Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH wurden Kristalle der orthorhombischen Kristallform für ca. 5 min in geeignete Stabilisierungslösungen einlegt, die diesen Inhibitor enthielten, anschließend in einer Lösung mit Cryoprotektant inkubiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die optimierte Stabilisierungslösung enthielt 14 mM TFA-Val-Tyr-Val-OH. Um zu verhindern, dass gebundene Inhibitor-moleküle während der Inkubation in der Cryoprotektionslösung aufgrund des Konzentrationsgefälles aus dem Kristall diffundieren, wurde auch der Cryoprotektionslösung 14 mM des Inhibitors zugesetzt. Die optimierte Cryoprotektionslösung enthielt 25 % PEG 8000, 0.1 Na-Kakodylat pH 6.5, 14 mM TFA-Val-Tyr-Val-OH, 6 % DMSO und 15 % Glycerin.

Um Ko-Kristalle von HNE mit dem Inhibitor WO24700 herzustellen, wurde PEG 3350 als Präzipitationsmittel verwendet (Tab. 3.13). Mit einer HNE-Proteinlösung, der der Inhibitor bereits zugesetzt war, entstanden hexagonale Kristalle mit Kantenlängen von 0.1 x 0.2 x 0.1 mm (Abb. 3.23c). Kristalle wurden geerntet und in eine Cryoprotektionslösung mit Glycerin überführt. Die optimierte Cryoprotektionslösung enthielt 20 % PEG 3350 (w/v), 0.2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>H-Citrat, pH 5.0 und 20 % Glycerin (v/v).

**Tab. 3.13:** Überblick über optimierte Kristallisationsbedingung des HNE-WO24700-Komplexes

Kristallisationsbedingung	HNE - WO24700, hexagonale Kristallform
Reservoir	20 % PEG 3350 (w/v) 0.2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> H-Citrat, pH 5.0
Proteinkonzentration	10 mg/ml
Proteinpuffer	10 mM HEPES/NaOH, pH 6.5
Temperatur	20 °C
Tropfen	0.8 µl Proteinlösung + 0.8 µl Reservoir

#### 3.2.3 Diffraktionsmessungen der HNE-Kristalle

Der Diffraktionsdatensatz eines Kristalls der freien HNE ohne Inhibitor konnte unter Verwendung von Synchrotronstrahlung (DESY, Hamburg) bis zu einer Auflösung von 1.86 Å vermessen werden. Am gleichen Messplatz wurde außerdem ein Datensatz eines HNE-Kristalls aus einem Ko-Kristallisationsexperiment mit dem Inhibitor WO24700 bis zu einer Auflösung von 2.0 Å aufgenommen.

Datensätze des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes wurden auf einer institutseigenen Drehanode aufgenommen. Es zeigte sich, dass die Kristalle durch die Behandlung mit Stabilisierungslösungen, die Inhibitoren enthielten, leicht beschädigt wurden. Neben der Verwendung von Cu-K $\alpha$ -Strahlung einer Drehanode ist aus diesem Grund die Datenqualität im Vergleich zu Messungen der Kristalle des HNE-Apo-Enzyms und der HNE-WO24700-Kokristalle deutlich schlechter. Dennoch konnte für den Komplex mit dem Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH eine Auflösung bis 2.5 Å erzielt werden. Tabelle 3.14 zeigt die wichtigsten statistischen Parameter der gemessenen Datensätze von Kristallen des Apo-Enzyms und der HNE-Inhibitorkomplexe. Die kristallographischen Raumgruppen der verschiedenen Kristallformen konnten durch Analyse der Symmetrie der Röntgenreflexe und der systematischen Auslöschungen nach der Integration eindeutig identifiziert werden. Die erhaltenen Kristalle der Raumgruppe P6<sub>3</sub> sind isomorph zu den von Wei et al. (1988) beschriebenen Kristallen.

**Tab. 3.14:** Statistische Parameter der gemessenen Diffraktionsdatensätze der HNE

Probe	HNE-Apo	HNE-WO24700	HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH
Raumgruppe	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P6 <sub>3</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Messplatz	X31 (DESY)	X31 (DESY)	Nonius (Institut für Biochemie)
Wellenlänge (Å)	1.1	1.1	1.54178
Gitterkonstanten (Å)	a=b=123.22, c=68.82 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	a=b=73.73, c=70.66 $\alpha=\beta=90, \gamma=120^\circ$	a=69.31, b=123.88, c=126.98 $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Auflösung (Å)	41-1.86	35-2.0	60-2.5
gemessene Reflexe	1599060	396270	602985
unabhängige Reflexe	42465	14498	34025
Vollständigkeit (%) <sup>a</sup>			
insgesamt	99.4 (41-1.86 Å)	97.2 (35-2.0 Å)	92.9 (60-2.5 Å)
höchste Auflösung	95.8 (1.96-1.86 Å)	79.7 (2.07-2.0 Å)	87.6 (2.59-2.5 Å)
I/sigma			
insgesamt	16.2 (41-1.86 Å)	20.4 (35-2.0 Å)	16.4 (60-2.5 Å)
höchste Auflösung	3.5 (1.96-1.86 Å)	2.8 (2.07-2.0 Å)	3.1 (2.59-2.5 Å)
Redundanz			
insgesamt	7.2 (41-1.86 Å)	11.0 (35-2.0 Å)	5.8 (60-2.5 Å)
höchste Auflösung	7.0 (1.96-1.86 Å)	10.8 (2.07-2.0 Å)	5.7 (2.59-2.5 Å)
R <sub>merge</sub> <sup>b</sup>			
insgesamt	0.12 (41-1.86 Å)	0.09 (35-2.0 Å)	0.10 (60-2.5 Å)
höchste Auflösung	0.39 (1.96-1.86 Å)	0.35 (2.07-2.0 Å)	0.60 (2.59-2.5 Å)

<sup>a</sup> Verhältnis der Anzahl der möglichen Reflexe zur Anzahl der gemessenen Reflexe.

<sup>b</sup>  $R_{merge} = \frac{\sum |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum I(h,i)}$ .  $I(h,i)$  ist die Intensität der i-ten Messung von h und  $\langle I(h) \rangle$  ist der zugehörige Mittelwert von h über alle Messungen von h. Alle Messungen wurden summiert.

#### 3.2.4 Analyse des Inhaltes der asymmetrischen Einheit

Der Lösungsmittelgehalt der unterschiedlichen HNE-Kristallformen wurde wie für TmTop I angegeben bestimmt. Es wurde ein berechnetes Molekulargewicht von 23.3 kDa angenommen. Tabelle 3.15 zeigt, dass der Lösungsmittelgehalt für tetragonale und hexagonale Kristallformen zwischen 47.9 % und 55.8 % bei ein bzw. zwei Molekülen pro asymmetrische Einheit lag. Nach diesen Berechnungen waren drei bis sechs Moleküle pro asymmetrische Einheit für die orthorhombische Kristallform mit einem Lösungsmittelgehalt zwischen 36.5 % und 68.2 % möglich.

**Tab. 3.15:** Inhalt der asymmetrischen Einheiten der HNE-Kristalle.

Raumgruppe	Moleküle pro AU	$V_m$ [ $\text{\AA}^3/\text{Da}$ ]	Lösungsmittelanteil [%]
$P4_12_12$	2	2.8	55.8
$P6_3$	1	2.4	47.9
$P2_12_12_1$	3	3.9	68.2
	4	2.9	57.6
	5	2.3	47.1
	6	2	36.5

## 3 Ergebnisse und Diskussion

---

### 3.2.5 Strukturlösung und Verfeinerung

Die Strukturen der freien HNE und der Komplexe mit den Inhibitoren WO24700 und TFA-Val-Tyr-Val-OH wurden durch Molekularen Ersatz gelöst. Als Suchmodell wurde in allen Fällen die Protein-Struktur des HNE-Komplexes mit MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-CH<sub>2</sub>Cl (Navia et al., 1989; 1HNE) verwendet.

#### Strukturlösung und Verfeinerung des HNE-Apo-Enzyms

Die Kreuzrotationssuche zur Strukturlösung des HNE-Apo-Enzyms zeigte zwei eindeutige Lösungen. Durch darauf folgende Translationssuchen und Starre-Körper-Verfeinerungen konnten zwei Lösungen identifiziert werden, die sich bezüglich der berechneten Korrelationsfaktoren (Strukturfaktoramplituden, Intensität, Pattersonkorrelationsfaktor) und des R-Wertes deutlich von den übrigen Lösungen abhoben. (Tab. 3.16). Die Lösung bestätigte die Ergebnisse der Selbstrotationsfunktion, die zwei Moleküle mit zweizähliger nicht-kristallographischer Symmetrie pro asymmetrische Einheit ergab.

**Tab. 3.16:** Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz des HNE-Apo-Enzyms. Die ermittelten Lösungen für beide Moleküle der asymmetrischen Einheit sind untereinander aufgeführt. Die Translationsvektoren sind in Fraktionalkoordinaten angegeben, neben dem Korrelationsfaktor für beobachtete und berechnete Strukturfaktoramplituden ist der von AmoRE berechnete R-Wert aufgeführt.

	Rotation	Translation	Korrelationsfaktor	R-Wert
Rotationssuche	$\alpha=22.33^\circ$ $\beta=37.51^\circ$ $\gamma=331.74^\circ$		12.9	54.3
	$\alpha=80.94^\circ$ $\beta=78.47^\circ$ $\gamma=295.64^\circ$		12.7	54.5

	Rotation	Translation	Korrelationsfaktor	R-Wert
<b>Translationssuche</b>	$\alpha=22.33^\circ$ $\beta=37.51^\circ$ $\gamma=331.74^\circ$	$x=-0.1049$ $y=-0.3361$ $z=0.2916$	32.3	49.6
	$\alpha=80.94^\circ$ $\beta=78.47^\circ$ $\gamma=295.64^\circ$	$x=0.0653$ $y=-0.2039$ $z=0.0228$	34.9	48.6
<b>Verfeinerung</b>	$\alpha=22.73^\circ$ $\beta=36.97^\circ$ $\gamma=331.26^\circ$	$x=0.0653$ $y=-0.2035$ $z=-0.0235$	70.9	34.8
	$\alpha=80.64^\circ$ $\beta=78.41^\circ$ $\gamma=295.9^\circ$	$x=0.3954$ $y=0.1642$ $z=-0.2086$		

Die auf Grundlage dieser Lösung berechneten Elektronendichtekarten erlaubten die vollständige Modellierung der Struktur durch abwechselnde manuelle Anpassung und molekulare Verfeinerungsrechnungen. Die wichtigsten Schritte der Verfeinerung sind in Tabelle 3.17 dokumentiert. Die endverfeinerte Struktur besteht aus 228 Aminosäuren pro Molekül und enthält insgesamt 518 Wassermoleküle.

**Tab. 3.17:** Verfeinerung der HNE-Apo-Struktur.

Schritt	$R_{work}$ [%]	$R_{free}$ [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	33.5	-	-	Modell nach Molekularem Ersatz
2	24.2	28.8	-	Modell nach manueller Anpassung
3	18.9	24.7	518	Modell nach Wassereinbau
4	17.5	22.0	518	Modell nach Einbau von Oligosaccharidketten und Sulfat-Ionen

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### Strukturlösung und Verfeinerung des HNE-WO24700-Komplexes

Die Strukturlösung und Verfeinerung des HNE-WO24700-Komplexes wurde wie für das HNE-Apo-Enzym beschrieben durchgeführt. Das Inhibitormolekül WO24700 wurde vor dem letzten Zyklus der Verfeinerung in das Modell eingefügt. Tabelle 3.18 zeigt die Ergebnisse des Molekularen Ersatzes, Tabelle 3.19 die wichtigsten Schritte der Verfeinerung.

**Tab. 3.18** Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz des HNE-WO24700-Komplexes. Darstellung wie in Tab. 3.16.

	Rotation	Translation	Korrelationsfaktor	R-Wert
<b>Rotationssuche</b>	$\alpha=50.08^\circ$ $\beta=69.99^\circ$ $\gamma=274.05^\circ$		19.1	54.6
<b>Translationssuche</b>	$\alpha=50.08^\circ$ $\beta=69.99^\circ$ $\gamma=274.05^\circ$	$x=0.01$ $y=-0.43$ $z=0$	62.7	38.7
<b>Verfeinerung</b>	$\alpha=49.71^\circ$ $\beta=69.89$ $\gamma=272.91^\circ$	$x=0.0087$ $y=-0.428$ $z=0$	76.6	32.0

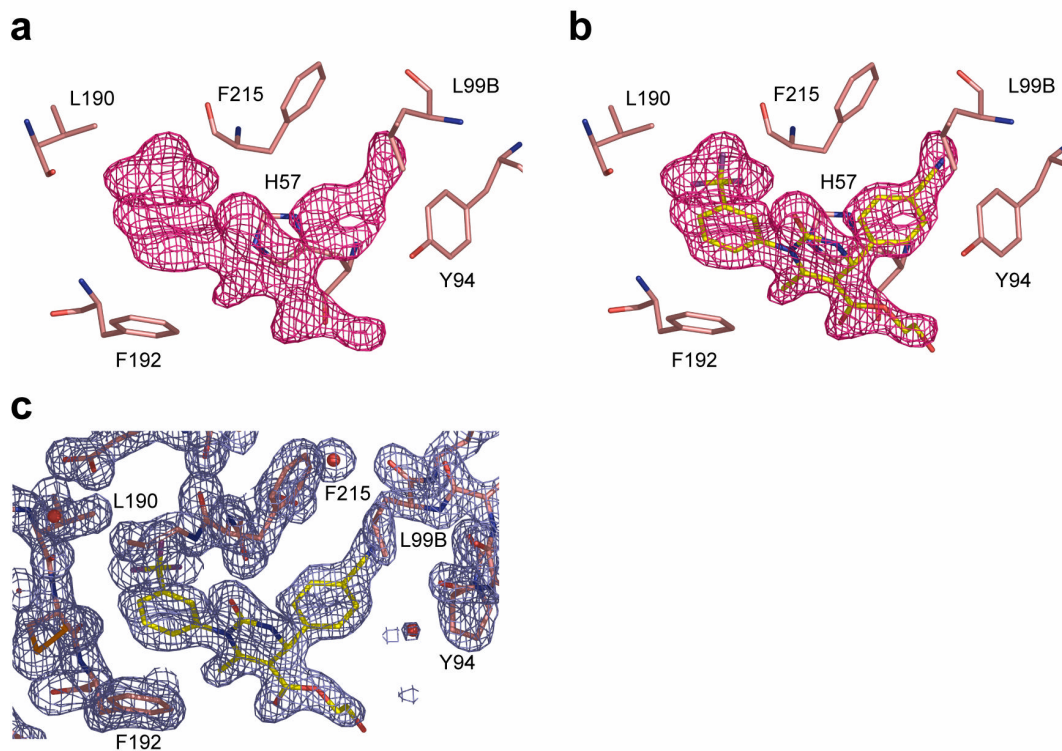
**Tab. 3.19:** Verfeinerung des HNE-WO24700-Komplexes

Schritt	$R_{work}$ [%]	$R_{free}$ [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	38.5	-	-	Modell nach Molekularem Ersatz
2	31.7	25.1	-	Modell nach manueller Anpassung
3	17.2	24.8	214	Modell nach Wassereinbau
4	15.3	21.4	214	Modell nach Einbau von Oligosaccharidketten und WO24700

Nach der Verfeinerung der Proteinstruktur und dem Einbau von Wassermolekülen wurden  $2|F_o|-|F_c|$ - und  $|F_o|-|F_c|$ -Elektronendichtekarten für den Bereich des aktiven Zentrums des Proteins berechnet (Abb. 3.24a). Diese Elektronendichten erlaubten die eindeutige Platzierung des Inhibitors (Abb. 3.24b). Die weitere Verfeinerung der Struktur zeigte, dass die Positionen beinahe aller Atome des Inhibitors eindeutig durch Elektronendichte definiert sind (Abb. 3.24c). Lediglich zwei Atome (C22 und O33) des Methylenhydroxyl-Restes am Ende des langen Ester-Substituenten des Pyrimidinrings



sind weniger klar definiert und scheinen flexibel zu sein. Die endverfeinerte Struktur besteht aus 228 Aminosäuren und enthält insgesamt 214 Wassermoleküle



**Abb. 3.24:** Differenz-Elektronendichtekarten von WO24700 im aktiven Zentrum der HNE. Aminosäurereste des Proteins sind braun gefärbt, der Inhibitor WO24700 ist gelb dargestellt. Heteroatome sind wie folgt gefärbt: Sauerstoff - rot, Stickstoff - blau, Fluor - violett. **a)**  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte (rot, konturiert mit  $3.5 \sigma$ ) nach der Verfeinerung des Proteinmodells vor Einbau des gebundenen Inhibitors. **b)** WO24700 platziert in diese  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte (rot, konturiert mit  $3.5 \sigma$ ). **c)**  $2|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte (blau, konturiert mit  $1.5 \sigma$ ) nach intensiver Verfeinerung des Komplexes.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### Strukturlösung und Verfeinerung des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes

Die Strukturlösung und Verfeinerung des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes wurde analog zum HNE-WO24700-Komplex durchgeführt. Das Inhibitormolekül TFA-Val-Tyr-Val-OH wurde vor dem letzten Zyklus der Verfeinerung in das Modell eingefügt. Tabelle 3.20 zeigt die Ergebnisse des Molekularen Ersatzes, Tabelle 3.21 die wichtigsten Schritte der Verfeinerung.

**Tab. 3.20:** Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes. Darstellung wie in Tab. 3.16.

	Rotation	Translation	Korrelationsfaktor	R-Wert
<b>Rotationssuche</b>	$\alpha=41^\circ$ $\beta=15.29^\circ$ $\gamma=74^\circ$		16.4	55.4
	$\alpha=101.71^\circ$ $\beta=85.56^\circ$ $\gamma=205.04^\circ$		16.1	55.4
	$\alpha=164.3^\circ$ $\beta=56.02^\circ$ $\gamma=176.5^\circ$		16	55.5
	$\alpha=33.79^\circ$ $\beta=73.99^\circ$ $\gamma=84.49^\circ$		15.9	55.7
<b>Translationssuche</b>	$\alpha=41^\circ$ $\beta=15.29^\circ$ $\gamma=74^\circ$	$x=0.4093$ $y=0.1364$ $z=0.1524$	26.2	52.7
	$\alpha=101.71^\circ$ $\beta=85.56^\circ$ $\gamma=205.04^\circ$	$x=0.3264$ $y=0.4158$ $z=0.3918$	25.6	53.1
	$\alpha=164.3^\circ$ $\beta=56.02^\circ$ $\gamma=176.5^\circ$	$x=0.1089$ $y=0.0503$ $z=0.0803$	23.8	53.6
	$\alpha=33.79^\circ$ $\beta=73.99^\circ$ $\gamma=84.49^\circ$	$x=0.1562$ $y=0.3208$ $z=0.2797$	22.6	54.2

	Rotation	Translation	Korrelationsfaktor	R-Wert
<b>Verfeinerung</b>	$\alpha=40.96^\circ$ $\beta=15.71^\circ$ $\gamma=74.01^\circ$	$x=0.4090$ $y=0.1360$ $z=0.1525$	68.4	36.4
	$\alpha=101.6^\circ$ $\beta=85.46^\circ$ $\gamma=205.2^\circ$	$x=-0.1732$ $y=-0.0840$ $z=0.3918$		
	$\alpha=164.94^\circ$ $\beta=55.81^\circ$ $\gamma=175.68^\circ$	$x=-0.3908$ $y=-0.4493$ $z=0.0802$		
	$\alpha=33.68^\circ$ $\beta=74.4^\circ$ $\gamma=82.28^\circ$	$x=-0.3449$ $y=-0.1789$ $z=-0.2201$		

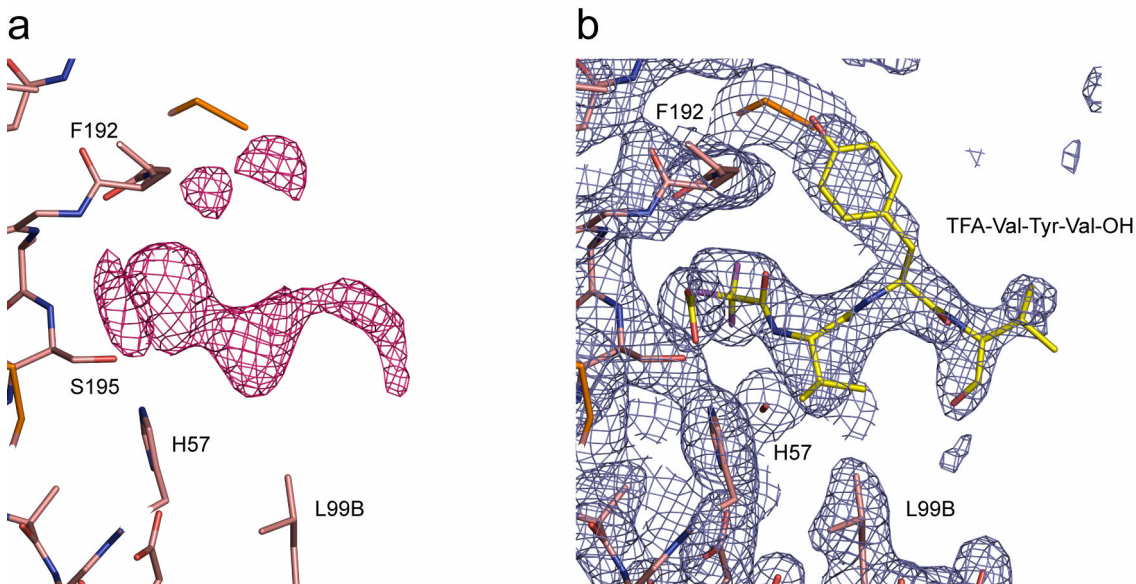
**Tab. 3.21:** Verfeinerung des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes

Schritt	$R_{work}$ [%]	$R_{free}$ [%]	Wasser- moleküle	Strukturmodell
1	33.5	-	-	Modell nach Molekularem Ersatz
2	22.8	28.5	-	Modell nach manueller Anpassung
3	20.2	26.1	434	Modell nach Wassereinbau
4	19.7	25.8	434	Modell nach Einbau von Oligosaccharidketten, $Zn^{2+}$ und TFA-Val-Tyr-Val-OH

Nach der Verfeinerung der Proteinstruktur berechnete  $2|F_o|-|F_c|$  und  $|F_o|-|F_c|$  Elektronendichtekarten für den Bereich des aktiven Zentrums des Proteins zeigten eindeutig die Bindung des Inhibitors in zwei der vier HNE-Monomere der asymmetrischen Einheit des Kristalls. (Abb. 3.25a). In zwei Monomeren war keine Elektronendichte für Inhibitormoleküle sichtbar. Demnach scheinen lediglich zwei der vier Monomere im Kristall den Inhibitor zu binden (Details siehe unten). Die Elektronendichten im aktiven Zentrum dieser Moleküle waren im Vergleich zu denen des HNE-WO24700-Komplexes weniger gut definiert. Dies ist einerseits mit großer Wahrscheinlichkeit auf die geringere Auflösung des verwendeten Datensatzes (2.5 Å gegenüber 2 Å für HNE-WO24700) zurückzuführen, kann zum anderen auch durch die verwendete Technik zur Herstellung des Komplexes verursacht worden sein. So reicht die kurze Zeit des *soakings*, bei der die Proteinmoleküle im Kristall Kontakt mit der inhibitorhaltigen Lösung haben, möglicherweise nicht aus, um alle Proteinmoleküle mit

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Inhibitormolekülen abzusättigen. Ein niedrigerer Besetzungsgrad von weniger als 100 % bewirkt eine im Verhältnis zum Protein schlechter definierte Elektronendichte.



**Abb. 3.25:** Differenz-Elektronendichtekarten von TFA-Val-Tyr-Val-OH im aktiven Zentrum der HNE. Aminosäurereste des Proteins sind braun gefärbt, der Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH ist gelb dargestellt. Heteroatome sind wie folgt gefärbt: Sauerstoff - rot, Stickstoff - blau, Fluor - violett. **a)**  $|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte rot, konturiert mit  $2.8 \sigma$  nach der Verfeinerung des Proteinmodells vor Einbau des gebundenen Inhibitors. **b)**  $2|F_o| - |F_c|$ -Elektronendichtekarte (blau, konturiert mit  $1 \sigma$ .) nach intensiver Verfeinerung des Komplexes.

Die weitere Verfeinerung der Struktur zeigte, dass die Positionen der meisten Atome des Inhibitors eindeutig durch Elektronendichte definiert sind. Die erhaltenen Elektronendichten erlaubten die eindeutige Platzierung des Inhibitors (Abb. 3.25b). Lediglich die Aminosäureseitenketten des Tyrosin- und des C-terminalen Valinrestes scheinen flexibel zu sein, so dass die Elektronendichte in diesen Bereichen etwas schwächer ist.

### 3.2.6 Qualität der HNE-Strukturen

Die Qualität der verfeinerten Modelle wurde anhand der stereochemischen Parameter der Verfeinerungsprogramme, visueller Inspektion der Elektronendichtekarten und Ramachandran-Plots beurteilt. Tabelle 3.22 zeigt die wichtigsten statistischen Parameter der verfeinerten HNE-Strukturen im Überblick. Im Hinblick auf die Auflösungen der Datensätze sind die erzielten R-Werte zufriedenstellend. Die ermittelten stereochemischen Parameter für Bindungslängen und Bindungswinkel sind verglichen mit den Idealwerten nach Engh und Huber (1991) sehr gut. Die Abweichungen liegen in Bereichen, die für Strukturen mit ähnlichen Auflösungen erwartet werden. Die berechneten Elektronendichten sind für alle in den Strukturen enthaltenen Atome eindeutig.

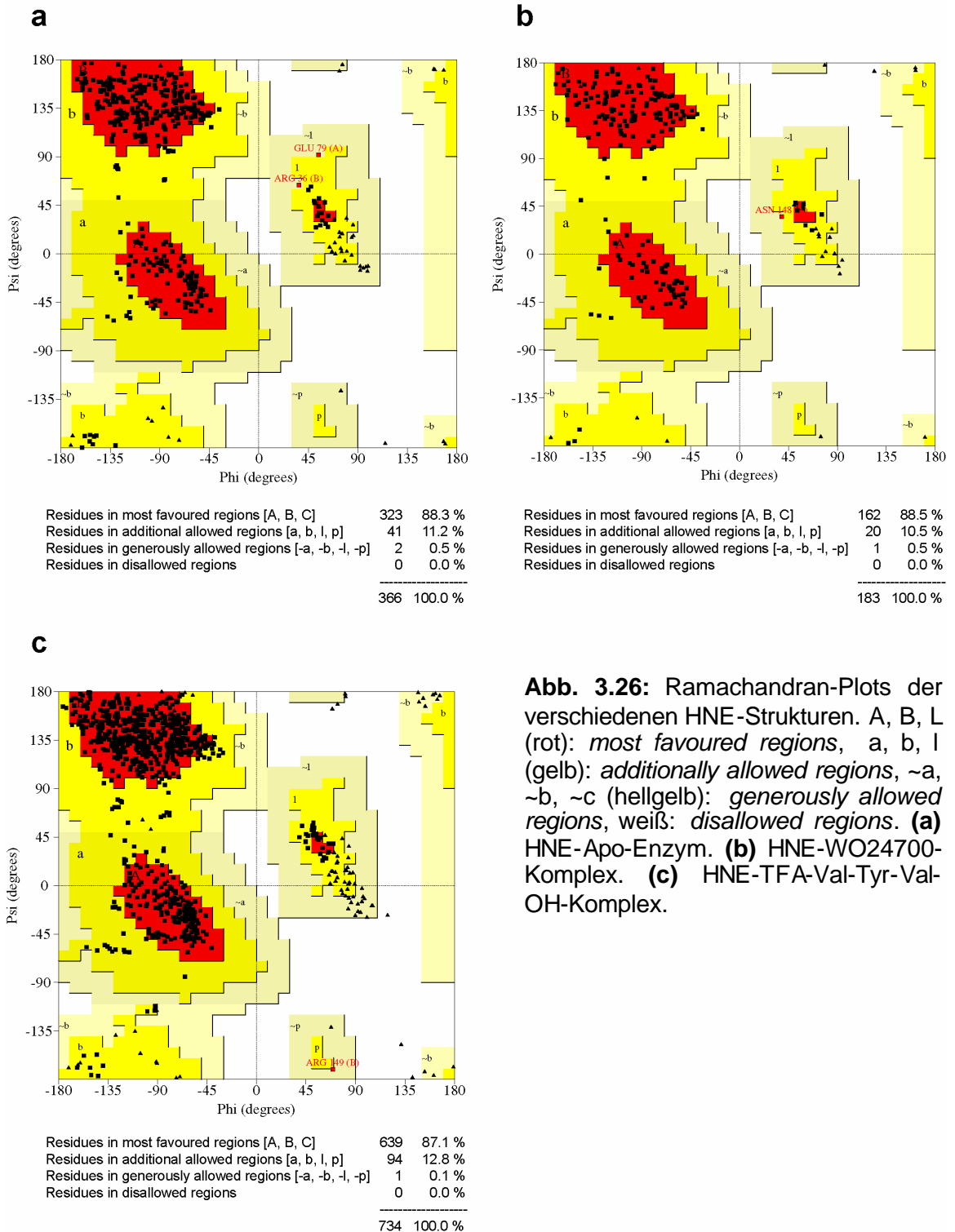
**Tab. 3.22:** Statistische Parameter der verfeinerten HNE-Strukturen.

Probe	HNE	HNE-WO24700	HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH
Raumgruppe	P4 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2	P6 <sub>3</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Auflösungsbereich (Å)	63-2.5	45-2.0	60-2.5
Moleküle pro asymmetrischer Einheit	2	1	4
Anzahl der Atome (ohne Wasserstoffatome )	3954	1933	7261
Anzahl der Wassermoleküle	518	214	434
R-Faktoren (%) <sup>a</sup>			
insgesamt	17.5 (21.9)	15.3 (21.4)	19.7 (25.8)
höchste Auflösungsschale <sup>b</sup>	22.9 (27.9)	21.4 (28.4)	26.9 (37.0)
isotrope B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )			
alle Proteinatome	15.97	20.72	28.66
Hauptkettenatome	14.71	19.06	27.92
Seitenkettenatome	17.41	22.62	29.50
Wasseratome	33.69	33.72	29.86
RMS Abweichungen von Idealwerten			
Bindungslängen (Å)	0.014	0.017	0.014
Bindungswinkel (°)	1.9	1.9	1.6
RMS Abweichungen zwischen Molekülen in der AU (Å)			
C $\alpha$ - Atome	0.2	-	0.22 (Ø)
alle Proteinatome	0.26	-	0.32 (Ø)

<sup>a</sup>  $R = \frac{\sum |Shkl| |Fo| - |Fc|}{\sum |Shkl| |Fo|}$ , Wert für  $R_{free}$  in Klammern

<sup>b</sup> 1.96-1.86 Å für HNE-Apo, 2.07-2.0 für HNE-WO24700, 2.59-2.5 für HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH

Ramachandran-Plots zeigen, dass in allen Strukturen über 87 % der Reste in den am stärksten favorisierten Regionen liegen (Abb. 3.26). Die restlichen Aminosäuren liegen in zusätzlich erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots. Es finden sich nur einzelne Aminosäuren in Regionen, die als *generously allowed* definiert sind. Die modellierten Konformationen von Aminosäureresten in diesen Regionen sind eindeutig durch Elektronendichte bestimmt. Insgesamt weisen die Strukturen eine hohe Qualität auf.



**Abb. 3.26:** Ramachandran-Plots der verschiedenen HNE-Strukturen. A, B, L (rot): *most favoured regions*, a, b, l (gelb): *additionally allowed regions*, ~a, ~b, ~c (hellgelb): *generously allowed regions*, weiß: *disallowed regions*. (a) HNE-Apo-Enzym. (b) HNE-WO24700-Komplex. (c) HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplex.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

---

### 3.2.7 Übersicht über die Struktur der HNE

Um einen einfachen Vergleich aller HNE-Strukturen zu ermöglichen, wird in der vorliegenden Arbeit durchgängig die von Hartley (1979) eingeführte Chymotrypsin-Nomenklatur für die Bezeichnung von Aminosäuren verwendet (Abb. 3.27). Bindetaschen des aktiven Zentrums der HNE werden mit der von Schechter und Berger (1967) verwendeten und im einleitenden Kapitel dieser Arbeit beschriebenen Nomenklatur bezeichnet.

---

16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
ILE	VAL	GLY	GLY	ARG	ARG	ALA	ARG	PRO	HIS	ALA	TRP	PRO	PHE	MET
31	32	33	34	35	36	38	39	40	41	42	43	44	45	46
VAL	SER	LEU	GLN	LEU	ARG	GLY	GLY	HIS	PHE	CYS	GLY	ALA	THR	LEU
47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61
ILE	ALA	PRO	ASN	PHE	VAL	MET	SER	ALA	ALA	HIS	CYS	VAL	ALA	ASN
62	62A	62B	63	64	65	65A	66	67	68	69	70	71	72	73
VAL	ASN	VAL	ARG	ALA	VAL	ARG	VAL	VAL	LEU	GLY	ALA	HIS	ASN	LEU
74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88
SER	ARG	ARG	GLU	PRO	THR	ARG	GLN	VAL	PHE	ALA	VAL	GLN	ARG	ILE
89	90	91	92	94	95	98	99	99A	99B	100	101	102	103	104
PHE	GLU	ASP	GLY	TYR	ASP	PRO	VAL	ASN	LEU	LEU	ASN	ASP	ILE	VAL
105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
ILE	LEU	GLN	LEU	ASN	GLY	SER	ALA	THR	ILE	ASN	ALA	ASN	VAL	GLN
120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134
VAL	ALA	GLN	LEU	PRO	ALA	GLN	GLY	ARG	ARG	LEU	GLY	ASN	GLY	VAL
135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	147	148	149	150
GLN	CYS	LEU	ALA	MET	GLY	TRP	GLY	LEU	LEU	GLY	ARG	ASN	ARG	GLY
151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	162	163	164	165	166
ILE	ALA	SER	VAL	LEU	GLN	GLU	LEU	ASN	VAL	THR	VAL	VAL	THR	SER
167	168	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	186A	187	188
LEU	CYS	ARG	ARG	SER	ASN	VAL	CYS	THR	LEU	VAL	ARG	GLY	ARG	GLN
188A	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	204
ALA	GLY	VAL	CYS	PHE	GLY	ASP	SER	GLY	SER	PRO	LEU	VAL	CYS	ASN
205	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221
GLY	LEU	ILE	HIS	GLY	ILE	ALA	SER	PHE	VAL	ARG	GLY	GLY	CYS	ALA
222	222A	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235
SER	GLY	LEU	TYR	PRO	ASP	ALA	PHE	ALA	PRO	VAL	ALA	GLN	PHE	VAL
236	237	238	239	240	241	242	243							
ASN	TRP	ILE	ASP	SER	ILE	ILE	GLN							

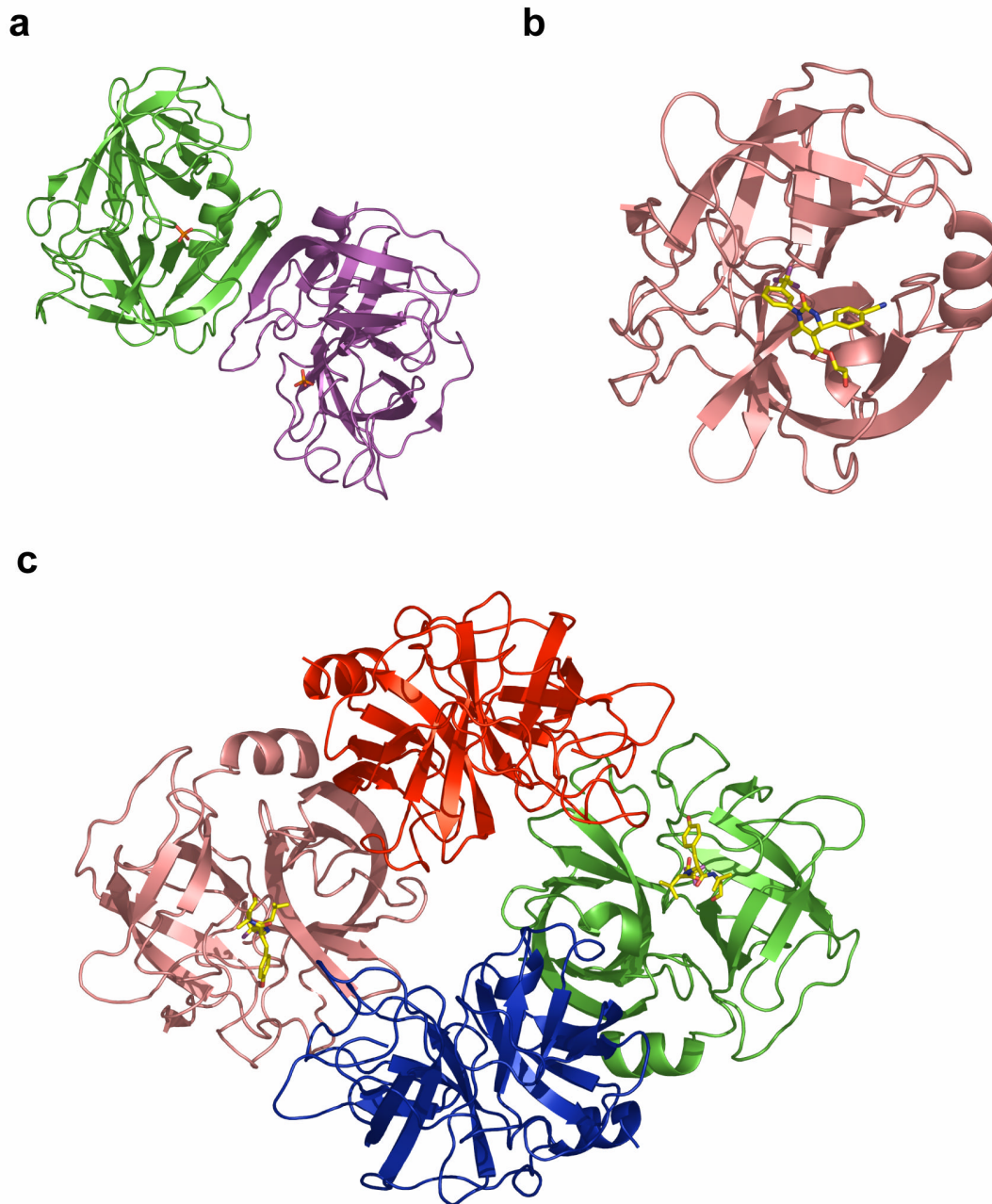
---

**Abb. 3.27:** Aminosäuresequenz der HNE. Nummerierung der Aminosäuren nach Hartley (1979).



HNE besitzt die typische Faltung von trypsin-ähnlichen Serinproteasen. Die gelösten 3D-Strukturen des Apo-Enzyms und der HNE-Inhibitor Komplexe ähneln bezüglich der Konformation des Proteins stark den veröffentlichten HNE-Inhibitor Komplexen (Bode et al., 1986; Cregge et al., 1998; Macdonald et al., 2002; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988). Die intensive Verfeinerung zeigte für alle Strukturen eindeutige Elektronendichten für die Aminosäuren 16 bis 243. Die Modelle enthalten somit 228 Aminosäuren pro HNE-Molekül, dies entspricht 93.8 % der Aminosäuresequenz des Enzyms. Abbildung 3.28 zeigt die Strukturen der freien HNE (Abb. 3.28a) und der Komplexe mit den Inhibitoren TFA-Val-Tyr-Val-OH (Abb. 3.28c) und WO24700 (Abb. 3.28b) im Überblick.

Die Struktur des Apo-Enzyms zeigt zwei HNE-Moleküle in der asymmetrischen Einheit des Kristalls, die durch die Bildung eines intermolekularen, zweisträngigen  $\beta$ -Faltblattes miteinander verbunden sind. Die Stränge des Faltblattes werden jeweils von den Aminosäuren 81-94 zweier HNE-Moleküle gebildet. Alle Aminosäurereste des aktiven Zentrums und der bekannten Substratbindetaschen sind in beiden Molekülen der asymmetrischen Einheit ähnlich positioniert. Unterschiede, die durch intermolekulare Kontakte im Kristall verursacht werden, sind in Oberflächenloops lokalisiert. Eine geringe RMS-Abweichung bezüglich aller  $C\alpha$ -Atome der beiden Moleküle bestätigt die geringen konformationellen Unterschiede. Abbildung 3.28a zeigt die zwei Moleküle der asymmetrischen Einheit des Apo-Enzyms mit jeweils einem Sulfat-Ion im aktiven Zentrum. Die Sulfat-Ionen stammen aus dem in der Reservoirlösung enthaltenen Ammoniumsulfat. Die Analyse der Kristallpackung bereits veröffentlichter HNE-Inhibitor Komplexe ergab, dass die Interaktion der Monomere über ein intermolekulares  $\beta$ -Faltblatt auch in Komplexen mit einem Pyrrolidin-Translactam-Derivat (Macdonald et al., 2002) und mit einem peptischen Inhibitor (Cregge et al., 1998) zu beobachten ist.



**Abb. 3.28:** Überblick des Inhaltes der asymmetrischen Einheiten der unterschiedlichen Kristallformen der HNE. Proteinmoleküle sind als Schleifendiagramme dargestellt. Sauerstoffatome der Inhibitoren sind rot, Stickstoffatome sind blau und Fluoratome sind violett gefärbt. Schwefelatome von Sulfat-Ionen sind orange gefärbt. **(a)** HNE-Apo-Enzym mit gebundenen Sulfat-Ionen im aktiven Zentrum. Die zwei Monomere der asymmetrischen Einheit sind grün und violett dargestellt. **(b)** HNE-WO24700-Komplex. Der Inhibitor (gelb) bindet im aktiven Zentrum des Enzyms (braun). **(c)** HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplex. In zwei der vier Monomere (grün, rot, blau, braun) der asymmetrischen Einheit ist der peptische Inhibitor (gelb) im aktiven Zentrum gebunden.

Die Struktur des HNE-Komplexes mit TFA-Val-Tyr-Val-OH (Abb. 28c) zeigt, dass von den vier Molekülen der asymmetrischen Einheit jeweils zwei ebenfalls über die Ausbildung eines intermolekularen  $\beta$ -Faltblattes miteinander interagieren, welches schon im HNE-Apo-Enzym beobachtet wurde. Das Tetramer der primitiv-orthorhombischen Kristallform kann als Dimer zweier Dimere beschrieben werden, wobei jedes Dimer das beschriebene, stabilisierende  $\beta$ -Faltblatt aufweist. Untereinander interagieren die beiden Dimere durch Van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken. Die Art der Wechselwirkungen lässt darauf schließen, dass die Interaktion innerhalb eines Dimers sehr viel stärker ist als zwischen den beiden Dimeren der asymmetrischen Einheit. Obwohl das Enzym in Lösung normalerweise als Monomer vorliegt und auch in dieser Form aktiv ist (Barrett, 1981), scheint die beschriebene Interaktion generell eine bevorzugte Quartärstruktur während der Kristallisation darzustellen. Wie schon beim Apo-Enzym beobachtet, ist die Konformation des Proteins in allen Molekülen der asymmetrischen Einheit nahezu identisch (RMS-Abweichung bezüglich aller  $C\alpha$ -Atome 0.32 Å). Abbildung 3.28c zeigt die vier HNE-Moleküle der asymmetrischen Einheit der primitiv-orthorhombischen Kristallform. Im aktiven Zentrum zweier Monomere ist der peptische Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH gebunden.

In Abbildung 3.28b ist der Komplex der HNE mit dem Inhibitor WO24700 dargestellt. Die Analyse der Kristallpackung der hexagonalen Kristallform zeigte keine vergleichbare Ausbildung von stabilisierenden intermolekularen  $\beta$ -Faltblättern. Die Zugabe des Inhibitors vor der Kristallisation scheint somit eine andere Assoziation der HNE-Moleküle im Kristall zu begünstigen. Die Kontakte zwischen symmetrieverwandten HNE-Molekülen im Kristall sind durch intensive Van-der-Waals-Wechselwirkungen gekennzeichnet.

Fourier-Elektronendichtekarten zeigen für alle Kristallformen zwei Oligosaccharidketten pro HNE-Molekül, die kovalent mit dem Enzym verbunden sind. N-glykosidische Bindungen werden mit den Seitenketten der Aminosäuren Asn159 und Asn109 gebildet. Die erste Glykosylierungsstelle weist drei eindeutig durch Elektronendichte definierte Pyranose-Zuckereinheiten auf. Ein  $\beta$ -D-N-Acetyl-Glukosamine (bezeichnet als Rest 401) ist kovalent mit Asn159 verbunden. Der Oligosaccharidkette folgend sind Verbindungen der ersten Pyranose mit einer  $\alpha$ -L-Fucopyranose (Rest 402) und einer weiteren  $\beta$ -D-N-Acetyl-Glukosamin-Einheit (Rest 403) sichtbar. Die Verknüpfung der Pyranosen erfolgt über 1,6-glykosidische (Bindung zwischen Rest 401 und 402) oder 1,4-glykosidische Bindungen (Rest 401 und 403). Die zweite Glykosylierungsstelle

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

zeigt eindeutige Elektronendichten für ein  $\beta$ -D-N-Acetyl-Glukosamin, das mit Asn109 verbunden ist. Die Oligosaccharidketten beider Glykosylierungsstellen sind zum Medium hin orientiert. Aufgrund ihrer Position und der Entfernung sind die Zuckerketten nicht in der Lage, das aktive Zentrum selbst oder die Bindung von Inhibitormolekülen zu beeinflussen.

His57 ist Teil der katalytischen Triade von Serinproteasen, die außerdem die Aminosäurereste Ser195 und Asp102 mit einschließt. Im Komplex der HNE mit einem Pyrrolidin-Translactam-Derivat (Macdonald et al., 2002) ist die Orientierung der Seitenkette His57 verändert. In dieser Struktur wird die Seitenkette durch zwei Wassermoleküle aus ihrer katalytischen Position verdrängt (Macdonald et al., 2002). In den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Strukturen des HNE-Apo-Enzyms und der Komplexe mit TFA-Val-Tyr-Val-OH und WO24700 bleibt die katalytische Position des His57 erhalten. Sie gleicht der beschriebenen Orientierung der Seitenkette in publizierten HNE-Komplexen mit peptidischen Inhibitoren (Bode et al., 1986; Cregge et al., 1998; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988).

#### 3.2.8 Struktur des HNE-Komplexes mit TFA-Val-Tyr-Val-OH

Die orthorhombische Kristallform der HNE besitzt vier Moleküle pro asymmetrischer Einheit. Wie in Abbildung 3.28c zu erkennen, bindet der peptische Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH in das aktive Zentrum von zwei HNE-Molekülen der asymmetrischen Einheit, die verbleibenden zwei weisen keine Differenz-Elektronendichte auf, die einem gebundenen Inhibitor zuzuordnen ist.

Im aktiven Zentrum von zwei HNE-Molekülen sind nahezu alle Atome des Inhibitors eindeutig definiert.  $2|F_o - F_c|$ -Elektronendichten für Atome der Seitenketten des Tyrosinrestes und des C-terminalen Valinrestes sind etwas schwächer als für den Rest des Inhibitormoleküls. Die Struktur beinhaltet zwei gebundene Zink-Ionen. Die Bindestellen liegen weit vom aktiven Zentrum des Enzyms entfernt an der Moleküloberfläche und haben keinen Einfluss auf die Bindung des Inhibitors. Sie sind im Kontaktbereich zweier HNE-Moleküle lokalisiert und werden von Hauptkettenatomen der Aminosäuren beider Moleküle gebildet (Molekül A bzw. B: Val176, Gly186A, Gly222A; Molekül C bzw. D: Arg149). In den mit Inhibitor besetzten aktiven Zentren ist zusätzlich ein Acetat-Ion im *oxanion-hole* lokalisiert. Die Entfernungen der Carboxyl-Sauerstoffatome zu Gly193 (Amid-Stickstoff; 3.1 Å) und

Ser195 (Seitenkettenatom O<sub>γ</sub>; 2.9 Å) bzw. zum katalytischen His57 (Seitenkettenatom N<sub>ε2</sub>; 2.9 Å) ermöglichen ideale Wasserstoffbrückenbindungen. Aufgrund dieser Interaktionen wurde für das Strukturmodell Acetat gegenüber DMSO bevorzugt, das ebenfalls in der Stabilisierungslösung vorhanden war, jedoch nicht in der Lage ist, die beobachteten Wasserstoffbrücken auszubilden.

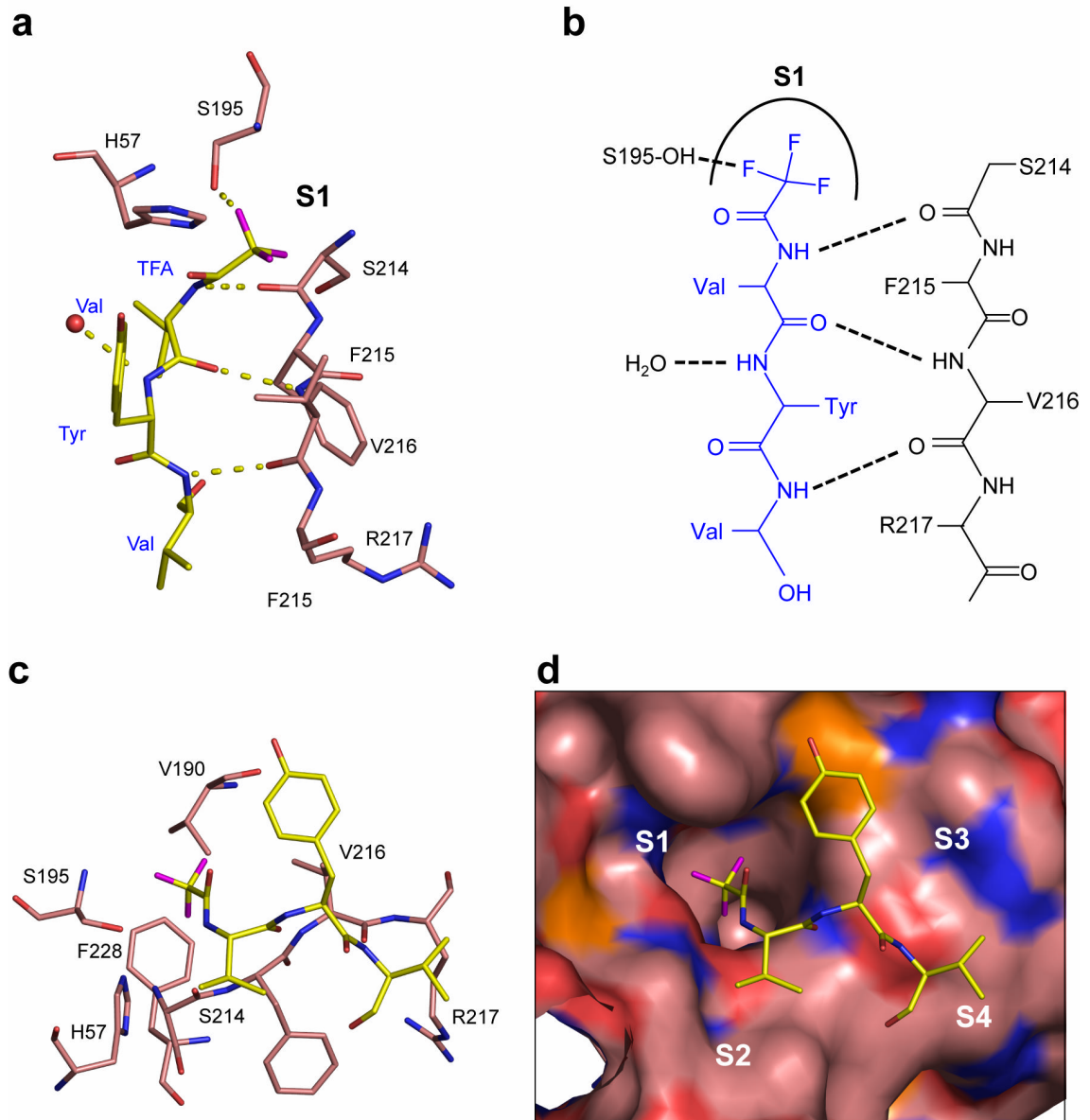
Die Besetzung von lediglich zwei der vier HNE-Moleküle durch den Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH ist durch die Anordnung der HNE-Moleküle im Kristall bedingt. Das aktive Zentrum der inhibitorfreien Proteinmoleküle ist schwer zugänglich, da enge Lösungsmittelkanäle den Zugang zu diesen Molekülen erschweren und eine effektive Diffusion von Inhibitormolekülen verhindern. Wichtiger sind allerdings Kristallkontakte zwischen den einzelnen Proteinmolekülen der asymmetrischen Einheit. Eine Analyse der aktiven Zentren aller vier Moleküle ergab, dass bei zwei Molekülen ein flexibler Loop direkt ins aktive Zentrum von jeweils benachbarten Molekülen reicht. Der Loop wird von den Aminosäuren Gln34 - His39 gebildet, wobei Arg34 die Bindetaschen S3 bis S5 besetzt. Da TFA-Val-Tyr-Val-OH bei der Bindung an HNE unter anderem mit diesen Taschen wechselwirkt (Details siehe unten), verhindert die Kristallpackung so effektiv die Besetzung des aktiven Zentrums von zwei HNE-Molekülen der asymmetrischen Einheit.

In Abbildung 3.29 ist die Bindung von TFA-Val-Tyr-Val-OH im aktiven Zentrum der HNE dargestellt. Die Trifluoroacetyl-Gruppe des Inhibitors bindet in die S1-Tasche der HNE (Abb. 3.29 c, d). Die gut definierte Elektronendichte für diese Gruppe ist annähernd kugelförmig. Aufgrund der Auflösung der Struktur von 2.5 Å lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, ob die Gruppe eine feste Orientierung besitzt oder frei drehbar ist. Eine mögliche Wasserstoffbrücke zwischen einem Fluoratom und der Hydroxylgruppe des katalytischen Serins 195 (2.7 Å) lässt allerdings vermuten, dass die Gruppe eine feste Orientierung innerhalb der S1-Bindetasche einnimmt. Der darauf folgende Valinrest des Inhibitors besetzt die S2-Tasche der Protease. Die Amidgruppe der Hauptkette dieses Restes interagiert über eine Wasserstoffbrücke (2.8 Å) mit dem Carbonyl-Sauerstoff von Ser214. Gemeinsam mit zwei weiteren Wasserstoffbrücken sorgt diese Interaktion für die Ausbildung einer  $\beta$ -faltblatt-ähnlichen Struktur zwischen Inhibitor und Protein (Abb. 3.29a, b). Die Carboxylgruppe des Valins interagiert mit der Amidgruppe von Val216 und bildet so die zweite Wasserstoffbrückenbindung dieser  $\beta$ -faltblatt-ähnlichen Struktur. Die Seitenkette des Valinrestes ist Richtung His57 orientiert, die Entfernung zwischen C $\beta$ -Atom und Ringebene des His57 liegt bei ca. 4.1 Å. Der Tyrosinrest des Inhibitors ist Richtung S3-Bindetasche orientiert. Bemerkenswert ist hier, dass der sperrige aromatische Rest in der Lage ist, den

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Phenylrings von Phe192 aus seiner Position über der S1-Tasche im Apo-Enzym teilweise zu verdrängen. Schwache Elektronendichten für die Tyrosin-Seitenkette des Inhibitors und für Phe192 weisen auf eine gewisse Flexibilität in diesem Bereich der Struktur hin. Möglicherweise nehmen die aromatischen Reste dieser Aminosäuren im Kristall unterschiedliche Konformationen an und sind deshalb schlechter durch eine schwächere Elektronendichte definiert. Alternative Konformationen der Seitenkette des Phe192 wurden auch in der Struktur des HNE-Komplexes mit einem Pyrrolidin-Translactam-Derivat beobachtet (Macdonald et al., 2002). Das C-terminale Valin des Inhibitors befindet sich in einer Position, die bei Substrat-ähnlichen Inhibitoren wie OMTKY von Hauptkettenatomen des P4-Restes besetzt werden. Eine Wasserstoffbrücke der Amidgruppe mit den Hauptketten-Carbonyl von Val216 (2.8 Å) führt zu einer weiteren Stabilisierung der  $\beta$ -faltblatt-ähnlichen Struktur zwischen Inhibitor und Protein (Abb. 29 a, b).



**Abb. 3.29:** Interaktionen der Bindetaschen von HNE mit TFA-Val-Tyr-Val-OH. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Bezeichnung der Bindetaschen von HNE entspricht der Nomenklatur nach Schechter und Berger (1967). Färbung der Atomtypen wie in Abb. 3.24. **(a)** Darstellung der Interaktionen des Inhibitors (gelb) im aktiven Zentrum der HNE (braun). **(b)** Schematische Darstellung der chemischen Struktur von TFA-Val-Tyr-Val-OH (blau) und der ausgebildeten Interaktionen zwischen HNE (schwarz) und dem Inhibitor. **(c)** Darstellung der Orientierung von TFA-Val-Tyr-Val-OH (gelb) und den interagierenden Aminosäuren des aktiven Zentrums (braun). **(d)** Molekulare Oberfläche des aktiven Zentrums (braun) mit TFA-Val-Tyr-Val-OH (gelb). Orientierung wie in (c).

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Trifluoroacetyl-Peptide wurden bisher strukturell intensiv in Komplexen mit der Elastase aus Schweinepankreas (PPE) untersucht. Die insgesamt sieben Kristallstrukturen von PPE-Trifluoroacetyl-Peptid-Komplexen lassen sich in zwei Gruppen unterteilen: Der Großteil der untersuchten Peptidderivate bindet an PPE in einem substrat-ähnlichen, konventionellen Bindungsmodus (Huges et al., 1982, 1EST; Sierra et al., 1990, 7EST; Mattos et al., 1994, 1ELA; Mattos et al., 1995, 1ELE, 1ELD). In Gegensatz dazu konnten für zwei Peptidderivate alternative Bindungsmodi beobachtet werden (Mattos et al., 1994; 1ELC, 1ELB). Obwohl diese Inhibitoren sich strukturell nur geringfügig von Inhibitoren mit konventionellem Bindungsmodus unterscheiden, fehlt hier der typische  $\beta$ -faltblatt-ähnliche Hauptkettenverlauf von Inhibitor und der Peptidkette Ser214 - Arg217 der Elastase. Das Beispiel verdeutlicht eindrucksvoll, wie wichtig strukturelle Informationen für die Analyse von Spezifitätsunterschieden einzelner Bindetaschen sind. In diesem Fall konnten falsche Schlussfolgerungen auf Grundlage kinetischer Messungen erst durch die Strukturaufklärung verschiedener PPE-Inhibitor Komplexe aufgedeckt werden (Mattos et al., 1994).

Der Komplex der HNE mit TFA-Val-Tyr-Val-OH zeigt, dass dieser Inhibitor konventionell über die Bildung der beschriebenen  $\beta$ -faltblatt-ähnlichen Struktur mit dem Protein interagiert. Es konnte gezeigt werden, dass HNE und PPE peptidische Trifluoroacetyl-Inhibitoren in ähnlicher Weise binden. Die Struktur unterstreicht des weiteren die Wichtigkeit von Trifluoro-Substituenten für eine effektive Besetzung der S1-Tasche der HNE.



### 3.2.9 Struktur des HNE-Komplexes mit WO24700

Nach Molekularem Ersatz und wenigen Verfeinerungszyklen zeigte eine sehr gut definierte Elektronendichte im aktiven Zentrum der HNE deutlich die Bindung des Inhibitors WO24700. Die Platzierung des Inhibitors und die anschließende Verfeinerung des Komplexes zeigten, dass alle Atome von WO24700 mit Ausnahme von C22 und O33 eindeutig durch Elektronendichte definiert waren. Diese Atome bilden den Methylenhydroxyl-Rest am Ende des langen Ester-Substituenten des Pyrimidinrings (Abb. 3.30a). Diese chemische Gruppe ist zum Lösungsmittel hin orientiert und bildet keine Interaktionen zum Protein aus. Es ist davon auszugehen, dass dieser Bereich des Inhibitors im Kristall unterschiedliche Konformationen einnimmt und deshalb keine eindeutige Elektronendichte erhalten werden konnte. WO24700 bindet ansonsten in einer einzigen, klar definierten Konformation im aktiven Zentrum des Proteins.

Der molekularen Struktur des Inhibitors folgend, bindet WO24700 in einer ausgedehnten Orientierung der drei substituierten Ringe an das Enzym. Dabei ist die Ringebene des Trifluoromethylphenyl-Substituenten beinahe senkrecht zur Ebene des zentralen Pyrimidinringes ausgerichtet ( $80^\circ$ ). In ähnlicher Weise nimmt der aromatische Ring des Cyanophenyl-Substituenten eine Orientierung ein, die durch einen Winkel von  $85^\circ$  im Bezug auf die Ringebene des Pyrimidinringes gekennzeichnet ist. Die beiden aromatischen Substituenten nehmen somit eine beinahe koplanare Konformation an. Sie sind vom zentralen Pyrimidinring weg orientiert und können so unterschiedliche Bindetaschen im aktiven Zentrum der HNE adressieren.

Der Trifluoromethylphenyl-Rest von WO24700 besetzt die S1-Bindetasche, während Teile des zentralen Pyrimidinringes und der Cyanophenyl-Substituent in der S2-Bindetasche des Enzyms lokalisiert sind. Die stark hydrophobe S1-Tasche wird als spezifitätsbestimmende Bindestelle von HNE betrachtet (Klebe et al. 2000). Sie wird von Seitenketten der Aminosäuren Phe192, Val190, Ala213 und Val216 gebildet. Durch Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass diese Bindetasche bevorzugt kleine oder mittelgroße hydrophobe Liganden wie Alanyl-, Valyl- oder Leucyl-Reste bindet (Macdonald et al., 2002; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988).

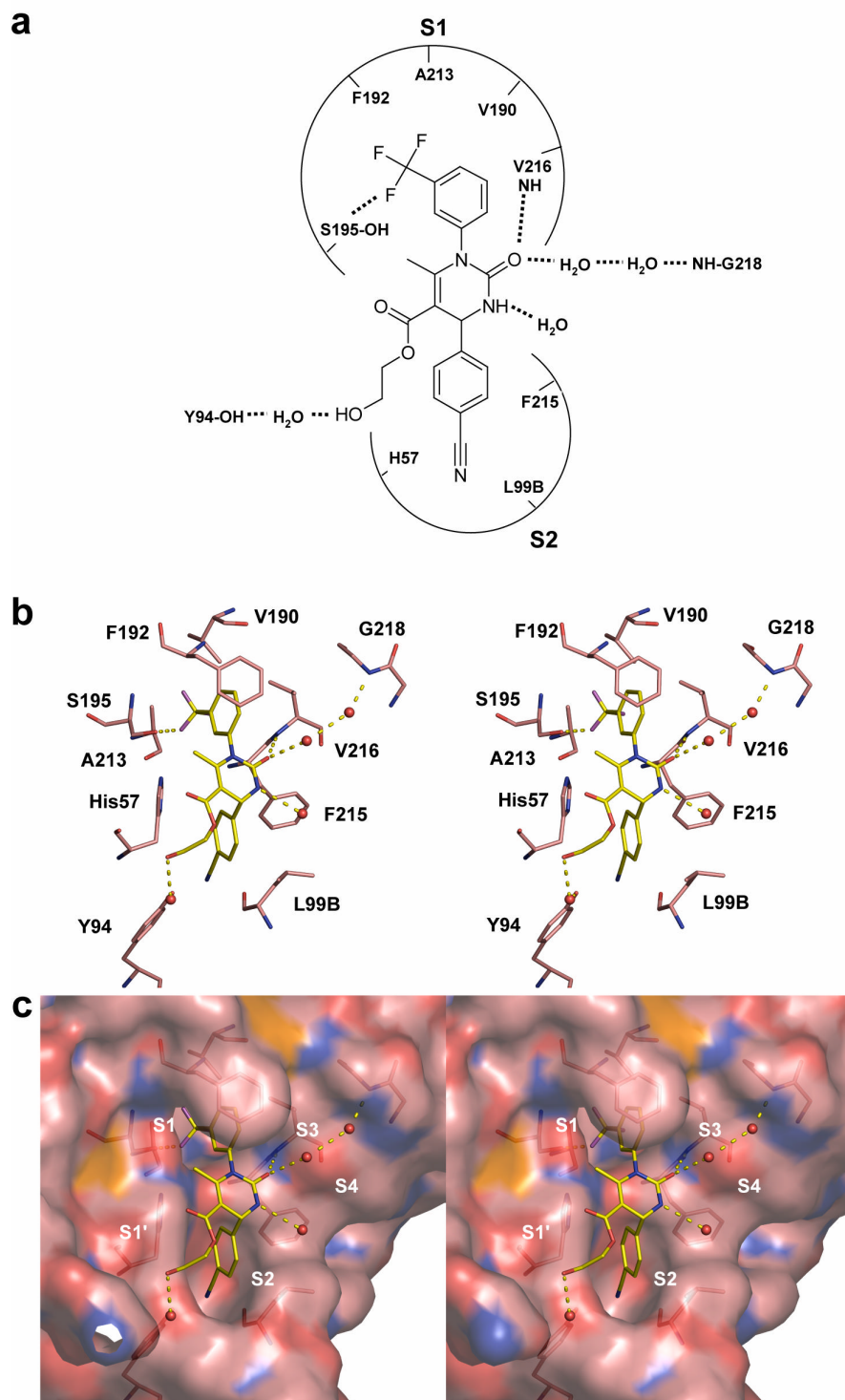
Die S2-Bindetasche wird in der Literatur als stark hydrophobe Bindestelle beschrieben, die von den Aminosäureresten His57, Leu99B und Phe215 gebildet wird. Inhibitoren, die die Positionierung von Resten wie Prolin (Macdonald et al., 2002; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988), Pyrrolidin (Macdonald et al., 2002) oder hydrophoben

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Bereichen von Threonin (Bode et al., 1986) in der S2-Tasche erlauben, sind in der Regel gute HNE-Inhibitoren.

Die wichtigste Interaktion in der S3-Bindetasche ist die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zwischen dem P3-Rest eines Inhibitors und der Hauptkette von Val216. In vier der fünf publizierten HNE-Komplexe (Bode et al., 1986; Cregge et al., 1998; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988) sind sowohl Amidrest als auch Carbonylrest von Val216 an der Ausbildung von Wasserstoffbrücken zum Inhibitor beteiligt. Der einzige HNE-Komplex mit einem nicht-peptidischen Inhibitor (Macdonald et al., 2002) zeigt keine direkten Interaktionen zwischen Inhibitor und Enzym in dieser Bindetasche. Die Interaktionen, die im HNE-WO24700-Komplex ausgebildet werden, sind schematisch in Abbildung 3.30a dargestellt. Abbildung 3.30b zeigt die Orientierung von WO24700 und die an der Bindung beteiligten Aminosäurereste. In Abbildung 3.30c ist eine molekulare Oberfläche des aktiven Zentrums des Enzyms aus derselben Perspektive dargestellt.



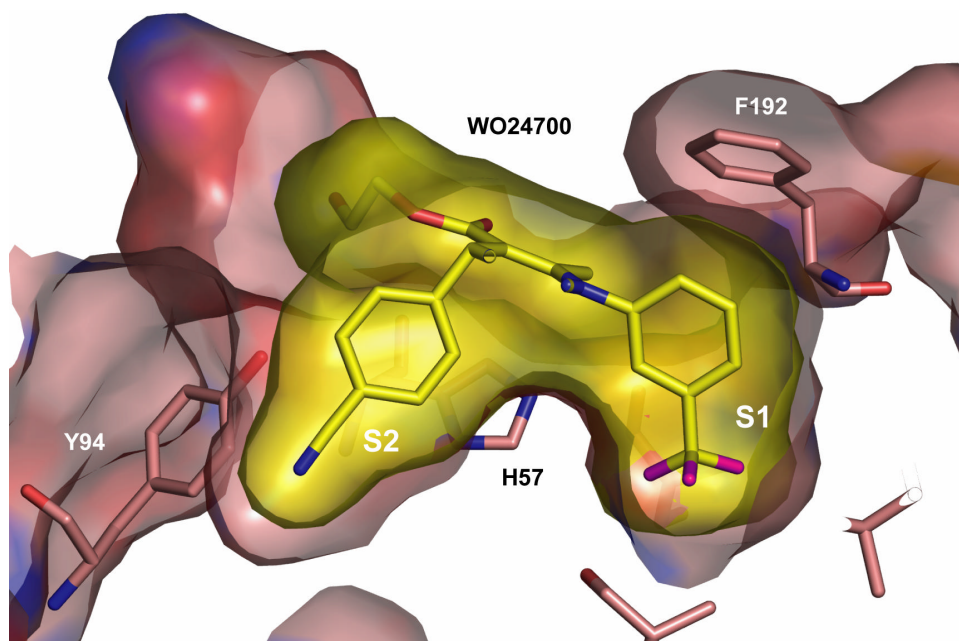
**Abb. 3.30:** Interaktionen der Bindetaschen von HNE mit WO2470. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Bezeichnung der Bindetaschen von HNE entspricht der Nomenklatur nach Schechter und Berger (1967). Färbung der Atomtypen wie in Abb. 3.24. **(a)** Schematische Darstellung der chemischen Struktur von WO2470 und der ausgebildeten Interaktionen zwischen HNE und dem Inhibitor. **(b)** Stereodarstellung der Orientierung von WO2470 und den interagierenden Aminosäuren des aktiven Zentrums. **(c)** Stereodarstellung der Oberfläche des aktiven Zentrums mit WO2470.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

---

Der Trifluoromethylphenyl-Rest von WO24700 bindet tief in die hydrophobe S1-Tasche der Protease (Abb. 3.30). Die Interaktionen in dieser Bindetasche basieren hauptsächlich auf Van-der-Waals-Kontakten zwischen dem aromatischen Rest des Inhibitors und den hydrophoben Resten Val190, Ala213 und Val216 des Enzyms. Zusätzlich werden  $\pi$ - $\pi$ -Interaktionen zwischen dem Phenylring von Phe192 und dem Trifluoromethylphenyl-Rest des Inhibitors ausgebildet. Die Entfernung der Zentren der Ringsysteme beträgt 4.7 Å. Die Seitenkette von Phe192 ist so orientiert, dass sie, ähnlich einem Deckel, die S1-Bindetasche mit dem Trifluoromethylphenyl-Rest nach außen hin zum Medium abschirmt (Abb. 3.30). Eines der Fluoratome der Trifluoromethylphenyl-Gruppe befindet sich mit 3.15 Å zum  $\gamma$ -Sauerstoffatom des katalytischen Ser195 in geeigneter Entfernung, um eine Wasserstoffbrückenbindung auszubilden.

Komplexe mit peptischen Inhibitoren zeigen, dass Val216 sehr wichtig für die Bindung ist, da die Hauptkettenatome dieser Aminosäure sowohl als Wasserstoffbrücken-Donatoren (Amidgruppe) als auch als Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (Carbonylgruppe) fungieren. Val216 bildet zwei Wasserstoffbrücken mit der Hauptkette peptidischer Inhibitoren, die in einer  $\beta$ -faltblatt-ähnlichen Konformation orientiert sind. WO24700 interagiert mit Val216 über eine Wasserstoffbrücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des zentralen Pyrimidinrings und der Amidgruppe der Hauptkette von Val216. Dieser Carbonylrest ist zusätzlich über ein Wassermolekül mit der Amidgruppe der Hauptkette von Gly218 verbunden (Details in Abbildung 3.30a und 3.30b). Ein Stickstoffatom des Pyrimidins ist in geeigneter Entfernung, eine Wasserstoffbrücke (2.95 Å) zu einem weiteren Wassermolekül auszubilden, das in Richtung S4-Bindetasche orientiert ist. Obwohl die Hydroxylgruppe am Ende des Ester-Substituenten des Inhibitors nicht eindeutig durch Elektronendichte definiert ist, wird wahrscheinlich eine Wasserstoffbrücke zu einem dritten Wassermolekül im aktiven Zentrum ausgebildet. Dieses Wassermolekül interagiert seinerseits über eine Wasserstoffbrücke mit der Hydroxylgruppe des Restes Tyr94 (2.7 Å).



**Abb. 3.31:** Oberflächendarstellung der Bindung von WO24700 in die Bindetaschen S1 und S2 der HNE. Aminosäurereste und Oberfläche des Proteins sind braun gefärbt, WO24700 ist gelb gefärbt dargestellt ist. Färbung der Atomtypen wie in Abb. 24.

Im HNE-WO24700-Komplex bildet die S2-Bindetasche eine tiefe, hydrophobe Kavität aus, die von Bereichen des zentralen Pyrimidinrings und vom Cyanophenyl-Substituenten des Inhibitors besetzt wird. Besonders auffällig ist die genaue Oberflächenkomplementarität von WO24700 und HNE in diesem Bereich des aktiven Zentrums (Abb. 3.31).

### 3.2.10 Struktureller Vergleich des HNE-Apo-Enzyms mit HNE-Inhibitorkomplexen

Der Vergleich der Strukturen des HNE-WO24700-Komplexes mit der Struktur des Apo-Enzyms zeigt nur einige wenige konformationelle Unterschiede außerhalb des aktiven Zentrums. Diese Unterschiede sollten keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms oder die Bindung von Inhibitoren haben.

Eine detaillierte Analyse des S1-Bindetasche zeigt, dass die Position des Phe192, welches die hydrophobe S1-Tasche im Apo-Enzym Deckel-ähnlich verschließt, im Komplex mit WO24700 leicht verändert ist (Abb. 3.30b, c). Eine Drehung um  $40^\circ$  um den Winkel  $\chi_2$  der Seitenkette positioniert den Phenylrest direkt über die S1-

### 3 Ergebnisse und Diskussion

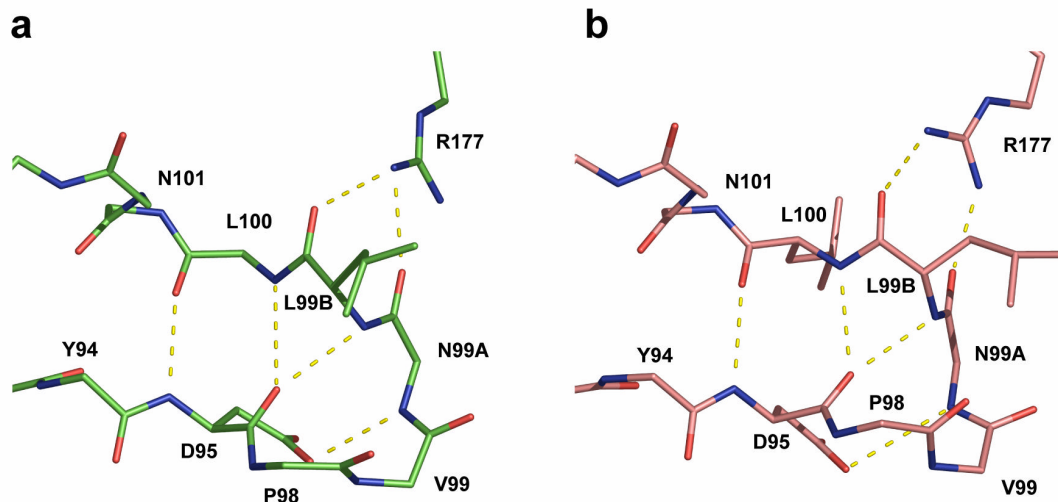
---

Bindetasche und erlaubt eine *edge-to-face*-Orientierung mit dem Phenylring des Trifluoromethylphenyl-Substituenten von WO24700. Die Ringebenen der beiden Aromaten stehen nicht senkrecht aufeinander, sondern bilden einen Winkel von 55°. Zusätzlich befindet sich das Zentrum des Rings von Phe192 nicht direkt über der Ringebene des Trifluoromethylphenyl-Substituenten. Der beobachtete Abstand der aromatischen Zentren (4.7 Å) und der Winkel der Ringebenen (55°) liegt in einem Bereich, der aromatische Interaktionen ermöglicht (Entfernung der aromatischen Zentren 4.5 - 7 Å, Winkel zwischen den aromatischen Ringebenen 50 - 90 °), wie eine Analyse von hochaufgelösten Proteinstrukturen zeigte (Burley und Petsko, 1985).

In der Apo-Struktur der HNE befindet sich ein Sulfat-Ion im aktiven Zentrum des Enzyms. Dieses Sulfat ist Teil eines Wasserstoffbrückennetzwerkes, das die Reste His57 (2.57 Å), Ser195 (2.51 Å) und zwei Wassermoleküle mit einschließt (3.2 Å). Im Vergleich mit der Komplexstruktur HNE-WO24700 sind die Positionen der Seitenkette von His57 und Ser195 leicht verändert, um eine bessere Geometrie der Wasserstoffbrücken zu ermöglichen. Ähnliche Interaktionen zwischen den katalytischen Aminosäureresten und einem Sulfat-Ion wurden auch in mehreren Strukturen der PPE beobachtet (Ding et al., 1994; Katona et al., 2002; Panjikar und Tucker, 2002; Sawyer et al., 1978; Wurtele et al., 2000).

Der wichtigste Unterschied zwischen Apo-Struktur und WO24700-Komplex betrifft die S2-Bindetasche des Enzyms. Die Hauptkette des Loops mit den Aminosäuren Tyr94, Asp95, Pro98, Val99, Asn99A und Leu99B befindet sich in der Nähe dieser Bindetasche und die Seitenketten des Loops bestimmen die Form der S2-Tasche. Der Loop nimmt eine  $\beta$ -faltblatt-ähnliche Konformation ein, die durch interne Wasserstoffbrücken stabilisiert wird (Abb. 3.32). Ein Vergleich der Hauptkettenkonformation dieses flexiblen Loops (Asp95 - Leu99B) in Apo-Struktur und WO24700-Komplex zeigt eine Verschiebung der Hauptkette um bis zu 2.1 Å (Abb. 3.32)

In der Apo-Struktur befinden sich die Carbonyl-Sauerstoffatome von Asp99A und Leu99B in einer Entfernung zu Arg177, die die Bildung einer Wasserstoffbrücke zu einem Stickstoffatom der Seitenkette des Arginins erlaubt (3.01 Å bzw. 2.83 Å; Abb. 3.32). Trotz der beträchtlichen Bewegung des flexiblen Loops im HNE-WO24700-Komplex bleibt dieses Wasserstoffbrückenmuster weitgehend erhalten. Im Inhibitor-Komplex ist die Seitenkette von Arg177 so ausgerichtet, dass Wasserstoffbrücken zwischen zwei Stickstoffatomen der Seitenkette des Arginins und den Carbonyl-Sauerstoffatomen von Asp99B und Leu99B ausgebildet werden können (Abb. 3.32).

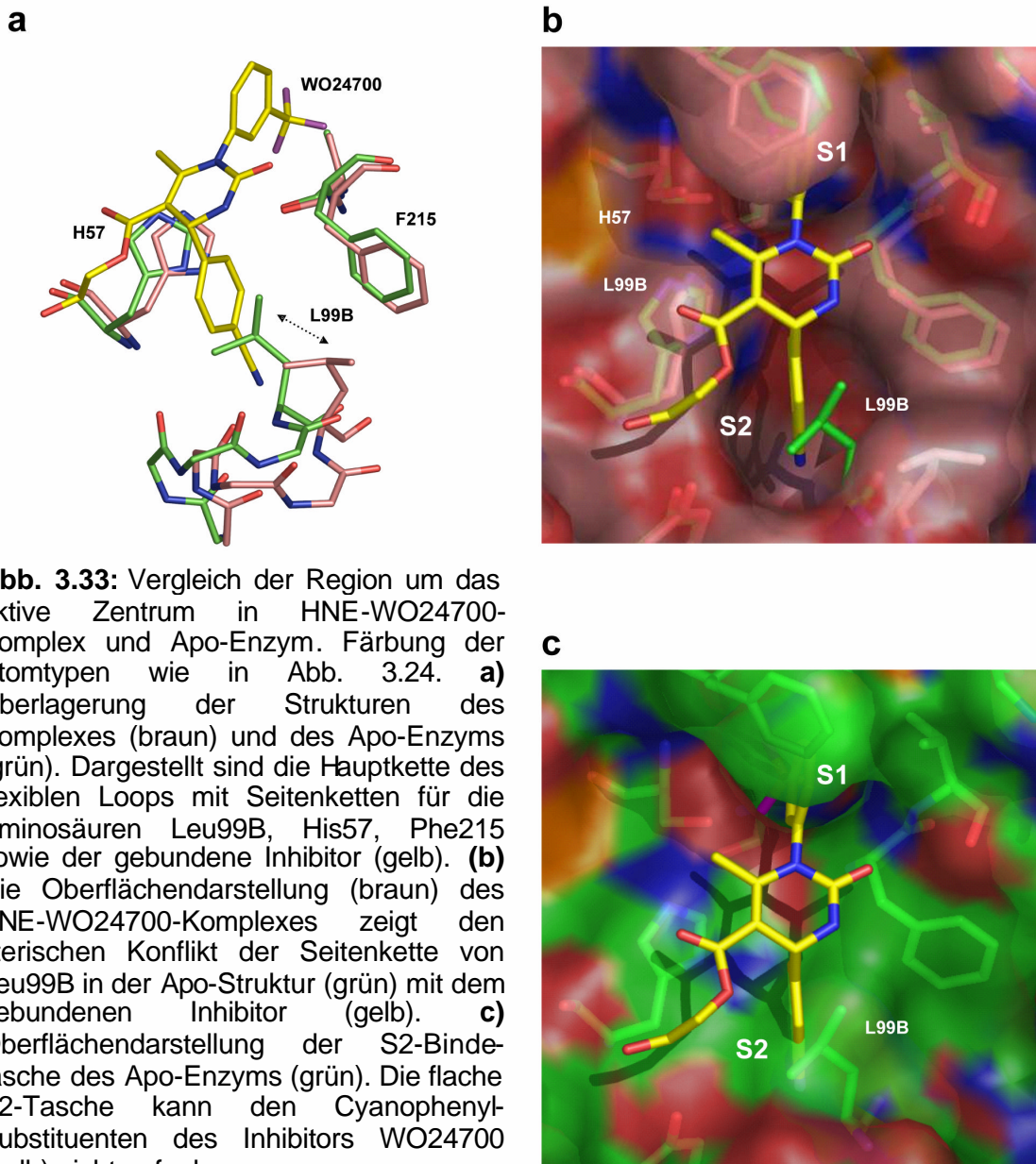


**Abb. 3.32:** Wasserstoffbrückenmuster innerhalb des flexiblen Loops (Asp95 - Leu 99B) der HNE in Apo-Struktur und im Komplex mit WO24700. Wasserstoffbrücken sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Färbung der Atomtypen wie in Abb. 3.24. **(a)** HNE Apo-Enzym (grün). **(b)** HNE-WO24700-Komplex (braun).

Die Position der Seitenkette von Leu99B ist im HNE-WO24700-Komplex im Vergleich zur Apo-Struktur stark verändert (Abb. 3.33a). Das C $\beta$ -Atom dieser Seitenkette weist eine Verschiebung von 2.6 Å auf. Diese Veränderung führt im HNE-WO24700-Komplex dazu, dass die Seitenkette eine Flanke der S2-Bindetasche bildet. In dieser Konformation ist die Seitenkette von Leu99B Richtung Medium orientiert und bewirkt deshalb die Öffnung der tiefen, hauptsächlich hydrophoben S2-Tasche im HNE-WO24700-Komplex. Die so ausgebildete Form der S2-Tasche kann den Cyanophenyl-Substituenten aufnehmen, wie die Oberflächendarstellungen in Abbildung 3.33b und 3.33c zeigen. Eine Überlagerung der Strukturen des WO24700-Komplexes mit der Apo-Struktur des Enzyms zeigt, dass in der Apo-Struktur die Seitenkette von Leu99B direkt in der erweiterten S2-Tasche der Komplex-Struktur positioniert ist (Abb. 3.33b). Umgekehrt stellt Abbildung 3.33c die Oberfläche des Apo-Enzyms überlagert mit der Struktur des HNE-WO24700-Komplexes dar.



### 3 Ergebnisse und Diskussion



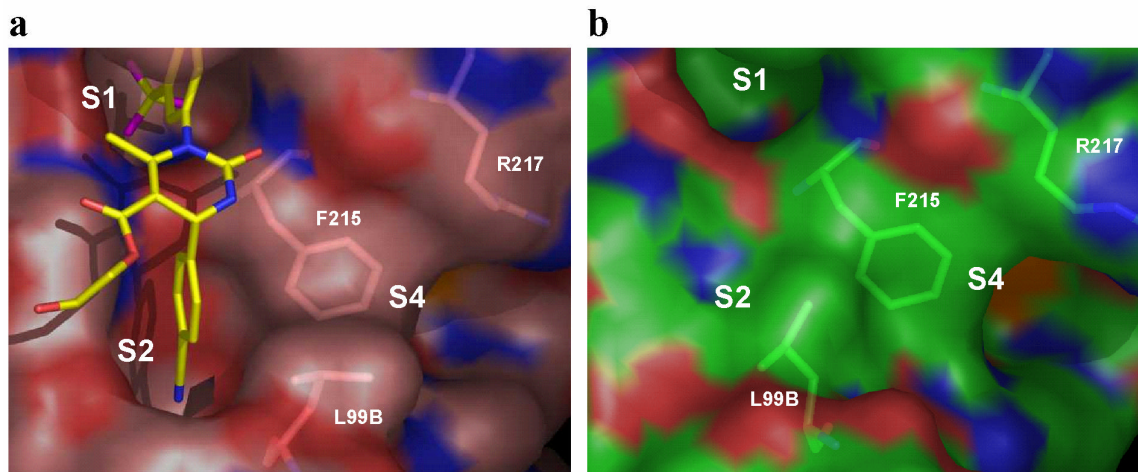
Die Konformation der Seitenkette von Leu99B im unkomplexierten Zustand des Enzyms führt zu einer stark begrenzten, relativ flachen S2-Bindetasche, die nicht in der Lage ist, den recht großen Cyanophenyl-Substituenten des Inhibitors WO24700 aufzunehmen (Abb. 3.33c). Die Bindung des Inhibitors erfolgt somit über einen *induced-fit*-Mechanismus, bei dem die Seitenkette des Leu99B so positioniert wird, dass eine fast perfekte räumliche Komplementarität zwischen Cyanophenyl-Substituent und S2-Bindetasche entsteht. Zusätzlich zu Veränderungen in der S2-Bindetasche wird



durch die Konformationsänderung des Leu99B auch die Form der benachbarten S4-Bindetasche beeinflusst.

Die hauptsächlich hydrophobe S4-Bindetasche wird von den Aminosäureresten Leu-99B, Phe-215, and Arg-217 begrenzt. Die bisher veröffentlichten HNE-Inhibitor-Komplexe zeigen, dass aliphatische oder aromatischen Reste der Inhibitoren wie Alanyl-, Phenyl- oder Pyrolidin-Gruppen bevorzugt mit dieser Tasche interagieren (Bode et al., 1986; Cregge et al., 1998; Macdonald et al., 2002; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988).

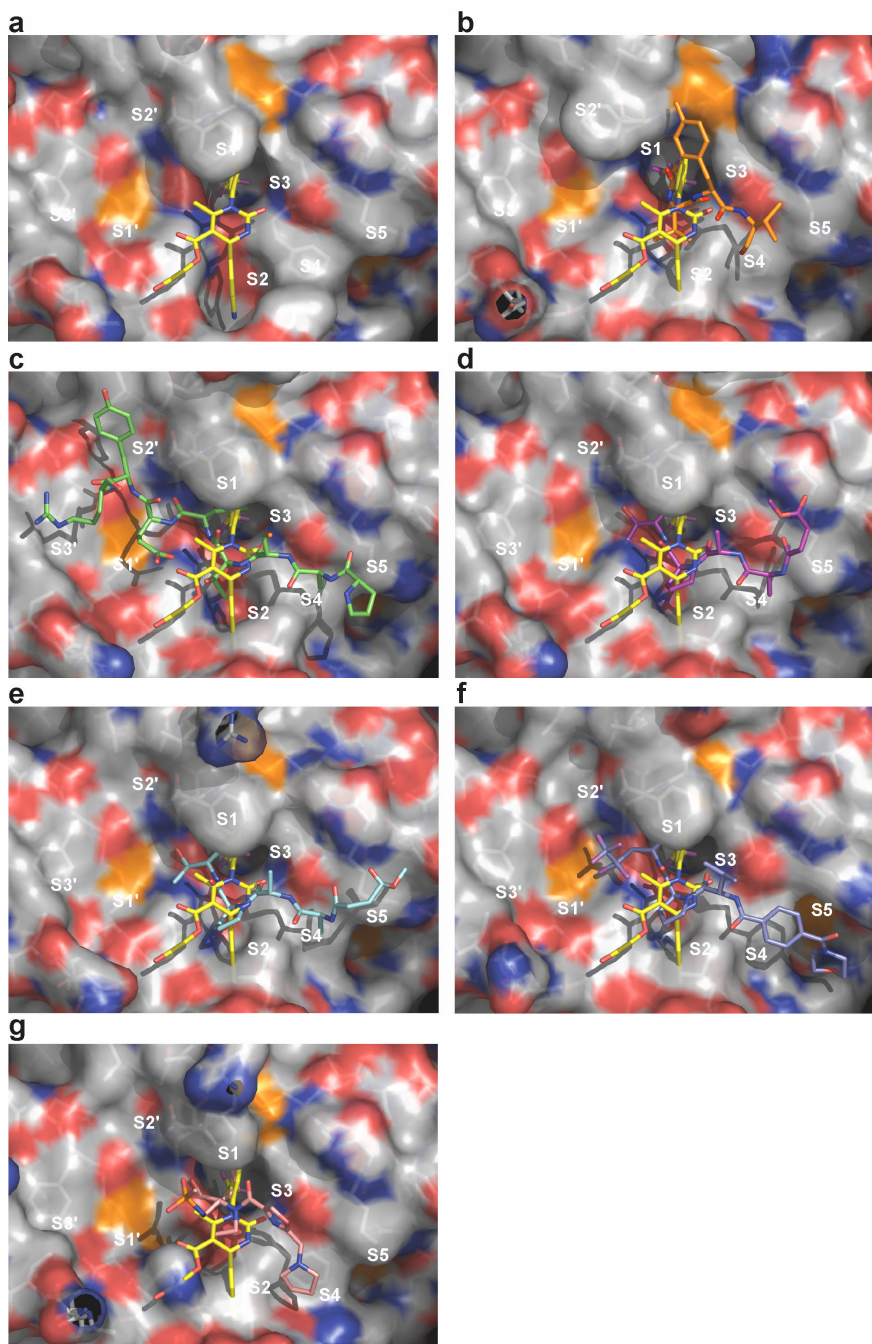
Im HNE-WO24700-Komplex wird die Form der S4-Bindetasche durch die vom Inhibitor induzierte Konformationsänderung des Restes Leu99B beeinflusst. Dieser Rest ist in der Komplexstruktur stärker in Richtung S4-Bindetasche orientiert. Andere Aminosäurereste, die die S4-Tasche bilden, werden hingegen nicht von der Bindung des Inhibitors beeinflusst und zeigen keine Veränderung ihrer Konformation. Die Konformation von Leu99B in der Apo-Struktur und anderen publizierten HNE-Komplexen führt zu einer stärkeren Ausprägung der S4-Bindetasche, wohingegen die S2-Bindetasche eher flach ist (Abb. 3.34b). Die Struktur des HNE-WO24700-Komplexes zeigt eine stark ausgeprägte, tiefe S2-Tasche und eine eher begrenzte S4-Bindetasche (Abb. 3.34a).



**Abb. 3.34:** Vergleich der S4-Bindetasche in HNE-WO24700-Komplex und Apo-Enzym. Oberflächendarstellung mit Seitenketten der S4-Bindetasche, Färbung der Atomtypen wie in Abb. 3.24. **(a)** HNE-WO24700-Komplex (braun) mit Inhibitor (gelb). **(b)** HNE Apo-Enzym (grün).

### 3.2.11 Struktureller Vergleich der HNE-Inhibitorkomplexe mit anderen publizierten HNE-Strukturen

Bisher wurden lediglich fünf verschiedene Kristallstrukturen von HNE-Inhibitorkomplexen veröffentlicht. Bode et al. (1986) beschrieb einen nicht-kovalenten Komplex der HNE mit Domäne 3 des Ovomukoid-Inhibitors (OMTKY3), einem Proteaseinhibitor mit einer Länge von 56 Aminosäuren. In vier weiteren Komplexen der HNE mit Kleinmolekülinhibitoren, werden kovalente Bindungen zwischen Inhibitor und His57 und/oder Ser195 ausgebildet (Bode et al., 1986; Cregge et al., 1998; Macdonald et al., 2002; Navia et al., 1989; Wei et al., 1988). Die Mehrzahl dieser Verbindungen besitzt eine peptidische Grundstruktur, der Komplex mit GW475151, einem Pyrollidin-Trans-Lactam-Derivat beschrieben von Macdonald et al, ist der einzige Inhibitor mit nicht-peptidischer Struktur. Bisher wurden weder HNE-Komplexe mit nicht-kovalenten, nicht-peptidischen Kleinmolekülinhibitoren beschrieben, noch konnte das Enzym im inhibitorfreien Zustand strukturell charakterisiert werden.



**Abb. 3.35:** Vergleich von HNE-Komplexen der Inhibitoren WO24700 und TFA-Val-Tyr-Val-OH mit publizierten HNE-Inhibitorkomplexen. Dargestellt ist die Proteinoberfläche des jeweiligen Komplexes überlagert mit einem Stabmodell des gebundenen Inhibitors. Um einen Vergleich zu erleichtern, ist in (b) - (g) zusätzlich ein Stabmodell von WO24700 überlagert dargestellt. Färbung der Atomtypen wie in Abb. 3.24. **(a)** HNE-Komplex mit WO24700 (gelb, vorliegende Arbeit). **(b)** HNE-Komplex mit TFA-Val-Tyr-Val-OH (orange, vorliegende Arbeit). **(c)** HNE-Komplex mit OMTKY3 (grün) aus 1PPF (Bode et al., 1986). **(d)** HNE-Komplex mit MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-CH<sub>2</sub>Cl (violett) aus 1PPG (Wei et al., 1988). **(e)** HNE-Komplex mit MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-CH<sub>2</sub>Cl (türkis) aus 1HNE (Navia et al., 1989). **(f)** HNE-Komplex mit MDL101146 (blau) aus 1BOF (Cregge et al., 1998). **(g)** HNE-Komplex mit GW475151 (braun) aus 1H1B (Macdonald et al., 2002).

### 3 Ergebnisse und Diskussion

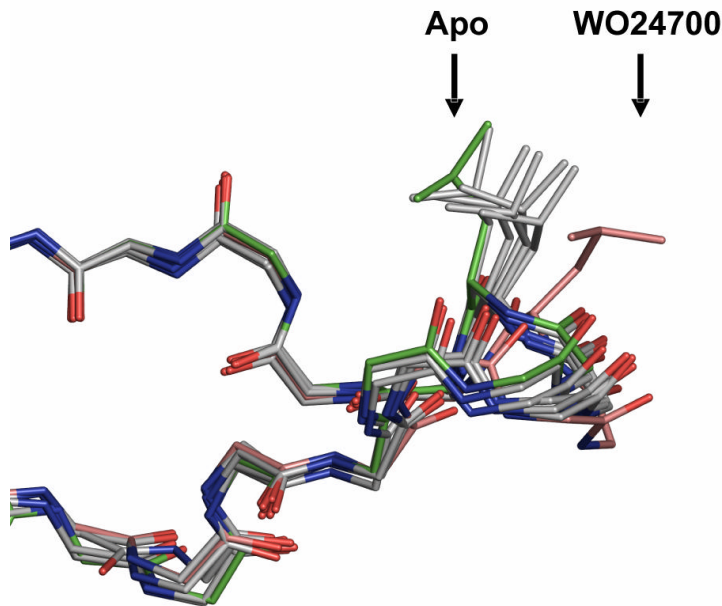
---

Abbildung 3.35 zeigt die Unterschiede bezüglich des Bindungsmodus von WO24700 und TFA-Val-Tyr-Val-OH im Vergleich mit publizierten HNE-Inhibitoren. Sowohl der HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplex als auch alle bisher publizierten HNE-Inhibitorkomplexe zeigen die Inhibitoren in einer Orientierung, die dem Bindungsmodus des Substrates ähnelt. Der HNE-Komplex mit OMTKY3 repräsentiert hier wohl die Struktur, die dem HNE-Substratkomplex strukturell am ähnlichsten ist. OMTKY3 adressiert Bindetaschen zu beiden Seiten der zu spaltenden Peptidbindung (S3' - S5), während die anderen Inhibitoren lediglich Bindetaschen besetzen, die C-terminal von der zu spaltenden Peptidbindung liegen (S1 - S5). Alle Komplexe mit kovalent bindenden Inhibitoren (MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-CH<sub>2</sub>Cl, MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-CH<sub>2</sub>Cl, GW475151 und MDL101146) interagieren kovalent mit Ser195. Die Chloromethylketon-Inhibitoren MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Ala-CH<sub>2</sub>Cl und MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-CH<sub>2</sub>Cl bilden zusätzlich eine kovalente Bindung zu His57 aus. Die Trifluoromethylgruppe des Inhibitors TFA-Val-Tyr-Val-OH ist in der S1-Bindetasche lokalisiert, es werden keine kovalenten Bindungen zum Enzym ausgebildet. Der Verlauf der Hauptkette von OMTKY3 und der anderen peptidomimetischen Inhibitoren folgt der Hauptkette des natürlichen Substrates und verläuft kollinear mit der Substratbindespalte des Enzyms (Abb. 3.35b-g). Im Kontrast dazu bindet WO24700 fast senkrecht zum Verlauf der Grundstruktur der anderen Inhibitoren (Abb. 3.35a). Obwohl WO24700 eine eher kompakte Struktur besitzt, kann der Inhibitor effektiv sowohl die S1- als auch die S2-Bindetasche der HNE durch seinen Trifluoromethyl- bzw. Cyanophenyl-Substituenten adressieren. Die S1-Bindetasche bildet eine tiefe, hauptsächlich hydrophobe Kavität. Ein Vergleich der Struktur dieser Bindetasche im Apo-Enzym und den Inhibitor-Komplexen lässt keine signifikanten Konformationsänderungen von Aminosäureresten erkennen, die die S1-Tasche bilden. Die Form dieser Bindetasche ist deshalb in allen HNE-Strukturen nahezu identisch. Interessanterweise zeichnet sich die Trifluoromethylgruppe von WO24700 durch eine nahezu perfekte Oberflächenkomplementarität zur S1-Tasche aus, die eine besonders tiefe Bindung dieses Substituenten ermöglicht (Abb. 3.31). Alle anderen Inhibitoren, einschließlich des „substratähnlichen“ OMTKY3, zeigen eine deutlich schlechtere Besetzung der S1-Bindetasche, die hauptsächlich auf die Orientierung der peptidischen oder peptid-ähnlichen Hauptkette zurückzuführen ist.

Ein völlig anderes Bild ergibt sich für die Besetzung der S2-Bindetasche der HNE. Die Bindetasche ist im Apo-Enzym eher flach und hauptsächlich hydrophob mit einer Präferenz für Aminosäurereste wie Alanin, Valin, Threonin oder Prolin. Veröffentlichte Inhibitoren zeichnen sich durch die Positionierung von Prolylresten (1HNE, 1PPG,

1B0F), Pyrrolidinresten (1H1B) oder Threonin-Seitenketten (1PPF) in der S2-Bindetasche aus. Die Interaktionen werden hauptsächlich von der Orientierung und Konformation der peptidischen oder peptidähnlichen Grundstruktur der Inhibitoren bestimmt. Die beobachteten Interaktionen beruhen größtenteils auf einer engen Packung der P2-Substituenten und der Aminosäurereste His57 und Leu99B. Im Gegensatz dazu zeigt WO24700 einen völlig andersartigen Bindungsmodus. Der Cyanophenyl-Substituent bindet tief eine ausgeprägte S2-Bindetasche, die durch eine Konformationsänderung des Loops Asp95 - Leu99B und besonderes durch eine Bewegung der Seitenkette von Leu99B entsteht (siehe Kapitel 3.2.9). Auch die S2-Bindetasche wird sehr gut von WO24700 besetzt, Enzym und Inhibitor weisen eine nahezu perfekte Oberflächenkomplementarität auf (Abb. 3.30 und Abb. 3.31). Der substituierte Pyrimidinring, der P1- und P2-Reste in WO24700 verbindet, nimmt eine Position ein, die beinahe der Position von P2-Resten von peptidischen Inhibitoren entspricht (Abb. 3.35b-g).

Der Loop Asp95 - Leu99B, dessen Konformation entscheidend für die Form der S2-Bindetasche ist, wurde bereits in einer früheren Publikation als flexibel beschrieben (Macdonald et al., 2002). Für den HNE-GW4755151-Komplex wurde vermutet, dass die Bindung des Inhibitors eine Verlagerung der Hauptkette verursacht. Diese Verlagerung sollte auf einen hydrophoben Kontakt zwischen Leu99B und dem Pyrrolidinringes des Inhibitors in der S4-Bindetasche zurückzuführen sein (Abb. 3.35g). In diesem Komplex ähnelt die Position der Hauptkette des flexiblen Loops sehr stark der Konformation im Apo-Enzym. Diese Anordnung kann als „geschlossene Konformation“ im Bezug auf die S2-Bindetasche bezeichnet werden. Eine Überlagerung der Struktur des Apo-Enzyms mit den Strukturen der HNE-Komplexe mit peptid-ähnlichen Inhibitoren zeigt lediglich kleine Unterschiede in der Konformation der Hauptkette des flexiblen Loop und der Seitenkette von Leu99B (Abb. 3.36).



**Abb. 3.36.:** Konformation des Loops mit den Aminosäuren Asp95 - Leu 99B in den unterschiedlichen Strukturen der HNE. Die Hauptkette des Loops und die Seitenkette von Leu99B sind wie folgt gefärbt: HNE-Apo-Enzym: grün, HNE-WO24700: braun, alle anderen Strukturen: grau (Leu99B-Seitenkette von links nach rechts: TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplex, 1H1B, 1B0F, 1PPG, 1HNE, 1PPF).

Die Orientierung der Seitenkette von Leu99B Richtung S2-Tasche verursacht eine eher flache Bindestelle ohne signifikante Kavität. Im HNE-WO24700-Komplex unterscheidet sich die Konformation des flexiblen Loops und der Seitenkette von Leu99B deutlich von allen anderen HNE-Strukturen (Abb. 3.36). Diese Konformation ermöglicht die Ausbildung der schon beschriebenen prägnanten S2-Bindetasche, die den Cyanophenyl-Substituenten des Inhibitors aufnimmt. Dementsprechend führt die Konformation des flexiblen Loops zur Ausbildung einer „offenen Konformation“ des Enzyms im Bezug auf die Bindung von Inhibitoren in die S2-Bindetasche.

Zusammenfassend repräsentieren die Strukturen des Apo-Enzyms und des WO24700-Komplexes zwei extreme Positionen der Leu99B-Seitenkette und stellen die Bedeutung der beobachteten Flexibilität des Loops Asp95 - Leu99B klar heraus. Das Wissen um diese Flexibilität ist ausschlaggebend für das Verständnis der Bindung des Inhibitors WO24700 und für die zukünftige Entwicklung neuer HNE-Inhibitoren.

### 4 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme Topoisomerase I aus *T. maritima* und die humane neutrophile Elastase röntgenkristallographisch untersucht. Beide Proteine wurden in Zusammenarbeit mit der BayerHealthCare AG bearbeitet und stellen wichtige Zielmoleküle für die Entwicklung von neuen medizinischen Wirkstoffen dar.

Zu Beginn der Entwicklung eines Wirkstoffes ermöglicht die röntgenkristallographische Untersuchung des Zielmoleküls eine genaue Analyse möglicher Interaktionsbereiche zwischen Enzym und Inhibitor. So kann die Kenntnis der räumlichen Struktur einzelner Bindetaschen und ganzer Proteindomänen entscheidenden Einfluss auf die Auswahl möglicher pharmakologischer Leitstrukturen haben.

Im Rahmen der Entwicklung eines Antibiotikums durch die BayerHealthCare AG sollte die strukturelle Analyse der Topoisomerase I aus *T. maritima* zu einem tieferen Verständnis dieser Enzymklasse führen und somit die wichtige Gruppe der Typ IA-Topoisomerasen näher charakterisieren. Diese Enzyme kontrollieren die Topologie von DNA-Molekülen innerhalb der Zelle. Die genaue Kontrolle der superhelikalen Dichte der DNA ist entscheidend für viele lebenswichtige zelluläre Prozesse wie zum Beispiel Transkription, Replikation und Rekombination. Die vorliegende Arbeit beschreibt die Klonierung, Expression und Reinigung der Topoisomerase I aus *T. maritima*. Nach der Kristallisation konnte die Struktur des Proteins bis zu einer Auflösung von 1.7 Å gelöst werden. Das Enzym besitzt die für Typ IA Topoisomerasen typische Faltung bezüglich der Domänen I-IV, die durch eine auffällige, große Öffnung im Zentrum der Struktur gekennzeichnet ist. Obwohl einige bemerkenswerte strukturelle Unterschiede erkennbar sind, ähnelt die Struktur der Domänen I-IV dem bereits beschriebenen N-terminalen Fragment der *E. coli* Topoisomerase I. Im Gegensatz zu bekannten Strukturen der Topoisomerase I aus anderen Organismen schließt die Struktur der Topoisomerase I aus *T. maritima* jedoch die C-terminale Region des Enzyms (Aminosäuren 543-601) mit ein. Diese Region bildet in der Struktur eine kompakte fünfte Domäne, die in direkter Nachbarschaft zu Domäne IV positioniert ist. Viele Topoisomerasen I enthalten Zink-Bindemotive in den jeweiligen C-terminalen Regionen, deren Funktion weitgehend ungeklärt ist. Die Struktur der Topoisomerase I aus *T. maritima* zeigt eindeutig, dass das Zink-Bindemotiv in Domäne V zur *zinc ribbon*-Familie gehört. Die Position von Domäne V in Bezug auf die Domänen I-IV und



## 4 Zusammenfassung

---

intensive Kontakte zu Domäne IV lassen vermuten, dass Domäne V eine wichtige Rolle bei der Bindung des DNA-Substrates spielt. Die Struktur der Topoisomerase I aus *T. maritima*, bestehend aus den Domänen I-V, erlaubt zum erstmalig die Analyse der Gesamtstruktur einer Topoisomerase I und lässt vermuten, dass Domäne V die Funktion einer erweiterten DNA-Bindespalte zur Interaktion mit dem Substrat besitzt. Nach Sequenzhomologien mit C-terminalen Regionen anderer Topoisomerasen zu urteilen, ist es möglich, dass die in der Topoisomerase I aus *T. maritima* beobachtete Interaktion der Domäne V mit der Domäne IV ein allgemeines strukturelles Organisationsmotiv von Typ IA Topoisomerasen widerspiegelt.

Auch nach der Identifikation von pharmakologischen Leitstrukturen, die mit einem bestimmten Zielprotein interagieren, kann die Röntgenkristallographie das Wirkstoffdesign entscheidend beeinflussen. So ermöglicht die genaue Kenntnis der 3D-Struktur von Protein-Inhibitor-Komplexen die gezielte Optimierung von Interaktionen zwischen Protein und Inhibitor.

Die zentrale Bedeutung der humanen neutrophilen Elastase (HNE) für die Entstehung und den Verlauf der Chronisch Obstruktiven Lungenerkrankung (COPD, engl. *chronic obstructive pulmonary disease*) macht das Enzym zu einem wichtigen Zielmolekül für die Entwicklung eines Wirkstoffes zur Therapie dieser Erkrankung. Von einem wirksamen, selektiven und oral verfügbaren HNE-Inhibitor wird erwartet, dass die fortschreitende Zerstörung der Lunge bei COPD-Patienten effektiv aufgehalten wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde die 3D-Struktur der HNE im Komplex mit zwei reversiblen Inhibitoren durch Röntgenkristallographie aufgeklärt. Die Struktur des HNE-Komplexes mit dem Trifluoroacetyl-Peptid-Inhibitor TFA-Val-Tyr-Val-OH konnte bis zu einer Auflösung von 2.5 Å bestimmt werden. Der Komplex der HNE mit dem Inhibitor WO24700 gelang bis zu einer Auflösung von 2.0 Å. Die chemische Struktur dieses Inhibitors basiert auf einem zentralen, substituierten Pyrimidinringsystem. Die BayerHealthCare AG konnte diese Substanzklasse als wichtige Leitstruktur zur Entwicklung eines wirksamen HNE-Inhibitors identifizieren. Zusätzlich konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die bisher nicht bekannte Struktur des unkomplexierten HNE-Apo-Enzyms bis zu einer Auflösung von 1.86 Å aufgeklärt werden. Alle Strukturmodelle weisen eine hohe Qualität auf.

Durch die erhaltenen Strukturdaten konnte der bisher unbekannt Bindungsmodus beider untersuchten Inhibitoren eindeutig ermittelt werden. Der HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplex zeigt, dass dieser Inhibitor ähnlich einem Protein-Substrat ins aktive Zentrum des Enzyms bindet. Die Trifluoromethylgruppe ist dabei in der S1-Tasche der



Protease lokalisiert, während der peptische Teil des Inhibitors eine  $\beta$ -faltblatt-ähnliche Konformation mit der Protease ausbildet. Ein ähnlicher Bindungsmodus wurde auch für andere Substrat-ähnliche Inhibitoren der Elastase aus Schweinepankreas (PPE, engl. *porcine pancreatic elastase*) beobachtet. Der HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplex ist der erste HNE-Komplex mit einem nicht-kovalent bindenden, reversiblen peptidischen Inhibitor. Es konnte gezeigt werden, dass HNE und PPE peptidische Trifluoroacetyl-Inhibitoren in ähnlicher Weise binden. Die Struktur unterstreicht des weiteren die Wichtigkeit von Trifluoro-Substituenten für eine effektive Besetzung der S1-Tasche der HNE.

Der Inhibitor WO24700 bindet in einer einzigartigen Orientierung ins aktive Zentrum der HNE. Die S1- und S2-Bindetaschen der Protease werden durch eine Trifluoromethylphenyl-Gruppe bzw. einer Cyanophenyl-Gruppe des Inhibitors adressiert. Die Interaktion der S1-Bindetasche, die eine tiefe, hydrophobe Kavität bildet, mit der Trifluoromethylphenyl-Gruppe zeichnet sich durch eine nahezu perfekte Oberflächenkomplementarität zwischen Enzym und Inhibitor aus. Im Vergleich zur Trifluoroacetyl-Gruppe des TFA-Val-Tyr-Val-OH-Inhibitors wird von der Trifluoromethylphenyl-Gruppe des Inhibitors WO24700 eine tiefere Bindung in die S1-Tasche erreicht. Andere bereits veröffentlichte HNE-Inhibitor Komplexe zeigen eine weniger tiefe Bindung in die S1-Bindetasche des Enzyms. Dies ist mit hoher Wahrscheinlichkeit auf den Substrat-ähnlichen Bindungsmodus dieser Inhibitoren zurückzuführen, der sich durch einen parallelen Verlauf der peptischen oder peptid-ähnlichen Grundstruktur der Inhibitoren und der Substratbindespalte des Enzyms auszeichnet.

Eine völlig andere Situation ist im Bezug auf die S2-Bindetasche des Enzyms zu beobachten. Diese Bindetasche ist im HNE-Apo-Enzym eher flach und wird in HNE-Komplexen mit peptischen Inhibitoren von kleinen, eher hydrophoben Resten besetzt. Im HNE-WO24700-Komplex nimmt diese Tasche eine völlig andere Form an. Der Cyanophenyl-Substituent des Inhibitors bindet hier in eine prägnante, hydrophobe und sehr tiefe S2-Bindetasche. Die dramatische Veränderung der Form dieser Tasche wird durch eine Konformationsänderung einer benachbarten Loopregion (Asp95 – Leu99B) und der Position der Seitenkette des Leu99B ausgelöst. Diese ungewöhnliche Konformation wird durch die Bindung des Inhibitors selbst verursacht und konnte weder im HNE-Apo-Enzym noch in einem anderen HNE-Inhibitor Komplex einschließlich des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes beobachtet werden. Wie schon für S1 beschrieben, zeichnet sich die Interaktion zwischen Enzym und Inhibitor innerhalb der S2-Bindetasche durch eine nahezu perfekte

## 4 Zusammenfassung

---

Oberflächenkomplementarität aus. Die beobachtete Position der Hauptkette Asp95 – Leu99B und der Seitenkette von Leu99B ist ein einzigartiges Merkmal des HNE-WO24700-Komplexes. Das Wissen um die strukturelle Flexibilität dieser Region und die mögliche Form der S2-Bindetasche ist entscheidend für das Verständnis des Bindungsmodus von WO24700 und die Entwicklung neuer HNE-Inhibitoren. Die Nutzung der Strukturen des HNE-Apo-Enzyms und des HNE-WO24700-Komplexes für das strukturbasierte Wirkstoffdesign wurde beim europäischen Patentamt als Patent angemeldet.

---

## Anhang

### A1 Kurzzusammenfassung

Die Röntgenstrukturanalyse erlaubt die Aufklärung der 3D-Struktur wichtiger medizinischer Zielmoleküle und ermöglicht so das gezielte Design neuer Wirkstoffe. In der vorliegenden Arbeit wurden die Enzyme Topoisomerase I aus *Thermotoga maritima* und die humane neutrophile Elastase röntgenkristallographisch untersucht. Die Topoisomerase I gehört zur Enzymklasse der Isomerasen und kontrolliert die Topologie der DNA des thermophilen Bakteriums *T. maritima*. Die humane neutrophile Elastase ist eine Serinprotease, die an der Aufrechterhaltung der Gewebestruktur der Lunge und an der Abwehr von eingedrungenen Krankheitserregern beteiligt ist. Beide Proteine stellen wichtige Zielmoleküle für die Entwicklung von medizinischen Wirkstoffen da.

Die Struktur der Topoisomerase I aus *Thermotoga maritima* zeigt, dass das Enzym aus insgesamt fünf Domänen besteht. Die Struktur der N-terminalen Domänen I-IV weist die typische Faltung von Typ IA Topoisomerasen auf. Die Domänen I-IV sind so angeordnet, dass eine große zentrale Öffnung umschlossen wird. Die bisher in bakteriellen Topoisomerasen I nicht strukturell charakterisierte C-terminale Region schließt in *Thermotoga maritima* ein Zink-Bindemotiv der *zinc ribbon*-Familie mit ein. Diese Region bildet eine zusätzliche, globuläre Domäne V, die an der Bindung von DNA-Substraten beteiligt ist. Die aufgeklärte Struktur der Topoisomerase I aus *Thermotoga maritima* mit einer Auflösung von 1.7 Å zeigt erstmalig die Gesamtstruktur einer prokaryotischen Topoisomerase I.

Mit Hilfe der Strukturen der humanen neutrophilen Elastase im Komplex mit zwei Inhibitoren des Enzyms, konnte der genaue Bindungsmodus eines nicht-peptidischen Inhibitors (Auflösung 2.0 Å) und eines peptidischen Inhibitors (Auflösung 2.5 Å) aufgeklärt werden. Ein Vergleich mit der Struktur des inhibitorfreien Apo-Enzyms (Auflösung 1.86 Å) und anderen bekannten HNE-Strukturen zeigt, dass die Bindung des nicht-peptischen Inhibitors eine Konformationsänderung der S2-Bindetasche im aktiven Zentrum der Protease auslöst. Das Wissen um die strukturelle Flexibilität der S2-Tasche ist entscheidend für das Verständnis der Interaktion zwischen Protein und Inhibitor und ermöglicht das Design von neuen, modifizierten Inhibitoren der humanen neutrophilen Elastase

### A2 Abstract

X-ray crystal structure analysis allows the three-dimensional structure solution of important drug targets and the structure-based rational design of drug molecules. The three-dimensional structures of topoisomerase I from *Thermotoga maritima* and human neutrophil elastase were determined by x-ray crystallographic analysis. Topoisomerase I is an isomerase that manages the DNA topology in the thermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. Human neutrophil elastase a member of the serine protease family takes part in maintaining the internal structure of the lung tissue and helps to neutralize invading pathogens. Both proteins are important targets for the development of new drug molecules.

Topoisomerase I from *T. maritima* consists of five domains. The structure of the N-terminal domains I-IV shows the typical fold of type IA topoisomerases enclosing a large central torus. In contrast the structure and function of C-terminal regions in procaryotic topoisomerases I is largely unknown. In the *T. maritima* enzyme the structure of this region includes a single zinc binding site of the zinc ribbon type and shapes an additional domain V, which probably takes part in the binding of DNA substrates. The structure of topoisomerase I from *T. maritima* at 1.7 Å resolution represents the first complete structure of a procaryotic topoisomerase I.

The structures of human neutrophil elastase (HNE) in complex with reversible inhibitors show the binding mode of a non-peptidic inhibitor (2.0 Å resolution) and a peptidic inhibitor (2.5 Å resolution). A comparison of the complex structures with the structure of the apo-enzyme (1.86 Å resolution) and other published HNE structures shows that the binding of the non-peptidic inhibitor leads to a conformational rearrangement of the S2-binding pocket in the active site of the protease. This structural flexibility of the S2-subsite is a key feature for the understanding of the binding mode of the inhibitor and should enable the design of new, potent HNE inhibitors.

### A3 Vorabveröffentlichungen

- Reinemer, P., Gielen, H., Rosentreter, U., Li, V., Harrenga, A., Schomburg, D., Niefind, K., Hansen, G. (2004) Schutzrechtsanmeldung BHC 04 1 021: Crystal structure of enzyme and uses thereof“ (HNE-Inhibitor).  
Die Anmeldung des Patentbes beim Europäischen Patentamt erfolgte am 16.12.2004.
- Hansen, G., Harrenga., A, Wieland, B., Schomburg, D. and Reinemer, P.  
Crystal structure of full length topoisomerase I from *Thermotoga maritima*.  
in Vorbereitung
- Hansen, G., Harrenga., A, Niefind, K., Reinemer, P. and Schomburg, D.  
Determination of the binding mode of WO24700 to human neutrophil elastase  
by X-ray crystal structure analysis of WO24700 in complex with human  
neutrophil elastase  
in Vorbereitung

### A4 Literaturverzeichnis

- Agarwal, K., Baek, K.H., Jeon, C.J., Miyamoto, K., Ueno, A. and Yoon, H.S. (1991) Stimulation of transcript elongation requires both the zinc finger and RNA polymerase II binding domains of human TFIIS. *Biochemistry*, **30**, 7842-7851.
- Ahumada, A. and Tse-Dinh, Y.C. (2002) The role of the Zn(II) binding domain in the mechanism of E. coli DNA topoisomerase I. *BMC Biochem*, **3**, 13.
- Akimkina, T., Ivanov, P., Kostrov, S., Sokolova, T., Bonch-Osmolovskaya, E., Firman, K., Dutta, C.F. and McClellan, J.A. (1999) A highly conserved plasmid from the extreme thermophile *Thermotoga maritima* MC24 is a member of a family of plasmids distributed worldwide. *Plasmid*, **42**, 236-240.
- Archer, M., Huber, R., Tavares, P., Moura, I., Moura, J.J., Carrondo, M.A., Sieker, L.C., LeGall, J. and Romao, M.J. (1995) Crystal structure of desulforedoxin from *Desulfovibrio gigas* determined at 1.8 Å resolution: a novel non-heme iron protein structure. *J Mol Biol*, **251**, 690-702.
- Aslund, F. and Beckwith, J. (1999) Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell*, **96**, 751-753.
- Baker, N.A., Sept, D., Joseph, S., Holst, M.J. and McCammon, J.A. (2001) Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10037-10041.
- Baldwin, M.A. and Benz, C.C. (2002) Redox control of zinc finger proteins. *Methods Enzymol*, **353**, 54-69.
- Barnes, P.J. (2000) Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med*, **343**, 269-280.
- Barrett, A.J. (1981) Leukocyte elastase. *Methods Enzymol*, **80 Pt C**, 581-588.
- Beese, L.S. and Steitz, T.A. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *Embo J*, **10**, 25-33.
- Bernstein, P.R., Edwards, P.D. and Williams, J.C. (1994) Inhibitors of human leukocyte elastase. *Prog Med Chem*, **31**, 59-120.
- Bieth, J.G. (1986) *Regulation of Matrix Accumulation*. Ed. Academic Press, New York.
- Bode, W., Wei, A.Z., Huber, R., Meyer, E., Travis, J. and Neumann, S. (1986) X-ray crystal structure of the complex of human leukocyte elastase (PMN elastase) and the third domain of the turkey ovomucoid inhibitor. *Embo J*, **5**, 2453-2458.
- Bond, C.S. (2003) TopDraw: a sketchpad for protein structure topology cartoons. *Bioinformatics*, **19**, 311-312.
- Bouthier de la Tour, C., Kaltoum, H., Portemer, C., Confalonieri, F., Huber, R. and Duguet, M. (1995) Cloning and sequencing of the gene coding for topoisomerase I from the extremely thermophilic eubacterium, *Thermotoga maritima*. *Biochim Biophys Acta*, **1264**, 279-283.
- Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Kaltoum, H. and Duguet, M. (1998) Reverse gyrase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: properties and gene structure. *J Bacteriol*, **180**, 274-281.
- Bouthier de la Tour, C., Portemer, C., Nadal, M., Stetter, K.O., Forterre, P. and Duguet, M. (1990) Reverse gyrase, a hallmark of the hyperthermophilic archaeobacteria. *J Bacteriol*, **172**, 6803-6808.
- Brown, P.O. and Cozzarelli, N.R. (1981) Catenation and knotting of duplex DNA by type 1 topoisomerases: a mechanistic parallel with type 2 topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 843-847.
- Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., Read, R.J., Rice,

- L.M., Simonson, T. and Warren, G.L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **54 ( Pt 5)**, 905-921.
- Burley, S.K. and Petsko, G.A. (1985) Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. *Science*, **229**, 23-28.
- Caron, P.R. and Wang, J.C. (1994) Appendix. II: Alignment of primary sequences of DNA topoisomerases. *Adv Pharmacol*, **29B**, 271-297.
- CCP4. (1994) The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **50**, 760-763.
- Champoux, J.J. (1990) *DNA Topology and Its Biological Effects*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor.
- Champoux, J.J. (2001) DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem*, **70**, 369-413.
- Changela, A., DiGate, R.J. and Mondragon, A. (2001) Crystal structure of a complex of a type IA DNA topoisomerase with a single-stranded DNA molecule. *Nature*, **411**, 1077-1081.
- Chen, H.T., Legault, P., Glushka, J., Omichinski, J.G. and Scott, R.A. (2000) Structure of a (Cys3His) zinc ribbon, a ubiquitous motif in archaeal and eucaryal transcription. *Protein Sci*, **9**, 1743-1752.
- Cheng, B., Zhu, C.X., Ji, C., Ahumada, A. and Tse-Dinh, Y.C. (2003) Direct interaction between Escherichia coli RNA polymerase and the zinc ribbon domains of DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **278**, 30705-30710.
- Corbett, K.D. and Berger, J.M. (2004) Structure, molecular mechanisms, and evolutionary relationships in DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, **33**, 95-118.
- Cowtan, K.D. and Zhang, K.Y. (1999) Density modification for macromolecular phase improvement. *Prog Biophys Mol Biol*, **72**, 245-270.
- Cregge, R.J., Durham, S.L., Farr, R.A., Gallion, S.L., Hare, C.M., Hoffman, R.V., Janusz, M.J., Kim, H.O., Koehl, J.R., Mehdi, S., Metz, W.A., Peet, N.P., Pelton, J.T., Schreuder, H.A., Sunder, S. and Tardif, C. (1998) Inhibition of human neutrophil elastase. 4. Design, synthesis, X-ray crystallographic analysis, and structure-activity relationships for a series of P2-modified, orally active peptidyl pentafluoroethyl ketones. *J Med Chem*, **41**, 2461-2480.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2002a) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J*, **21**, 942-953.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Schmidt, E. and Koehler, C.M. (2002b) The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J Cell Biol*, **158**, 1017-1027.
- Dean, F.B. and Cozzarelli, N.R. (1985) Mechanism of strand passage by Escherichia coli topoisomerase I. The role of the required nick in catenation and knotting of duplex DNA. *J Biol Chem*, **260**, 4984-4994.
- Dekker, N.H., Rybenkov, V.V., Duguet, M., Crisona, N.J., Cozzarelli, N.R., Bensimon, D. and Croquette, V. (2002) The mechanism of type IA topoisomerases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12126-12131.
- Dekker, N.H., Viard, T., de La Tour, C.B., Duguet, M., Bensimon, D. and Croquette, V. (2003) Thermophilic topoisomerase I on a single DNA molecule. *J Mol Biol*, **329**, 271-282.
- The PyMOL Molecular Graphics System DeLano, W.L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. DeLano Scientific, San Carlos, CA, USA.
- DiGate, R.J. and Mariani, K.J. (1988) Identification of a potent decatenating enzyme from Escherichia coli. *J Biol Chem*, **263**, 13366-13373.
- Dimicoli, J.L. and Bieth, J. (1978) On the inhibition of human leukocyte elastase by trifluoroacetyl tripeptides. *J Biol Chem*, **253**, 3459-3460.

- Dimicoli, J.L., Bieth, J. and Lhoste, J.M. (1976) Trifluoroacetylated peptides as substrates and inhibitors of elastase: a nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry*, **15**, 2230-2236.
- Ding, X., Rasmussen, B.F., Petsko, G.A. and Ringe, D. (1994) Direct structural observation of an acyl-enzyme intermediate in the hydrolysis of an ester substrate by elastase. *Biochemistry*, **33**, 9285-9293.
- Edwards, P.D. and Bernstein, P.R. (1994) Synthetic inhibitors of elastase. *Med Res Rev*, **14**, 127-194.
- Engh, R.A. and Huber, R. (1991) Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. *Acta Cryst.*, **A47**, 392-400.
- Evans, G. and Pettifer, R.F. (1996) Stabilisation and calibration of x-ray wavelengths for anomalous diffraction experiments using synchrotron radiation. *Rev. Sci. Instr.*, **67(10)**.
- Farley, D., Salvesen, G. and Travis, J. (1988) Molecular cloning of human neutrophil elastase. *Biol Chem Hoppe Seyler*, **369 Suppl**, 3-7.
- Forterre, P., Bergerat, A. and Lopez-Garcia, P. (1996) The unique DNA topology and DNA topoisomerases of hyperthermophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev*, **18**, 237-248.
- Gadek, J.E., Fells, G.A., Zimmerman, R.L., Rennard, S.I. and Crystal, R.G. (1981) Antielastases of the human alveolar structures. Implications for the protease-antiprotease theory of emphysema. *J Clin Invest*, **68**, 889-898.
- Griep, M.A. and Lokey, E.R. (1996) The role of zinc and the reactivity of cysteines in Escherichia coli primase. *Biochemistry*, **35**, 8260-8267.
- Grishin, N.V. (2000) C-terminal domains of Escherichia coli topoisomerase I belong to the zinc-ribbon superfamily. *J Mol Biol*, **299**, 1165-1177.
- Grygotis, M. (2000) *Mosaic Study # 24, Chronic obstructive pulmonary disease*. Decision Resources, Waltham, USA.
- Guipaud, O., Marguet, E., Noll, K.M., de la Tour, C.B. and Forterre, P. (1997) Both DNA gyrase and reverse gyrase are present in the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 10606-10611.
- Hanai, R., Caron, P.R. and Wang, J.C. (1996) Human TOP3: a single-copy gene encoding DNA topoisomerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 3653-3657.
- Hard, T., Rak, A., Allard, P., Kloo, L. and Garber, M. (2000) The solution structure of ribosomal protein L36 from Thermus thermophilus reveals a zinc-ribbon-like fold. *J Mol Biol*, **296**, 169-180.
- Harms, J., Schluenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F. and Yonath, A. (2001) High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, **107**, 679-688.
- Harris, J.L., Backes, B.J., Leonetti, F., Mahrus, S., Ellman, J.A. and Craik, C.S. (2000) Rapid and general profiling of protease specificity by using combinatorial fluorogenic substrate libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7754-7759.
- Hartley, B.S. (1979) Evolution of enzyme structure. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **205**, 443-452.
- Huber, R. and Bode, W. (1978) Structural basis of the activation and action of trypsin. *Acc. Chem. Res.*, **11**, 114-122.
- Huber, R., Langworthy, T.A., König, H., Thomm, M., Woess, C.R., Sleytr, U.B. and Stetter, K.O. (1986) Thermotoga maritima sp. nov. represents a new genus of unique extremely thermophilic eubacteria growing up to 90°C. *Arch. Microbiol.*, **144**, 324-333.
- Huber, R., Wilharm, T., Huber, D., Trincone, A., Burggraf, S., König, H., Rachel, R., Rockinger, I., Fricke, H. and Stetter, K.O. (1992) Aquifex pyrophilus gen. nov. sp. nov., represents a novel group of marine hyperthermophilic hydrogen-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol*, **15**, 340-351.



- Imperiali, B. and Abeles, R.H. (1986) Inhibition of serine proteases by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochemistry*, **25**, 3760-3767.
- Jackson, A.H., Hill, S.L., Afford, S.C. and Stockley, R.A. (1984) Sputum sol-phase proteins and elastase activity in patients with cystic fibrosis. *Eur J Respir Dis*, **65**, 114-124.
- Jakob, U., Muse, W., Eser, M. and Bardwell, J.C. (1999) Chaperone activity with a redox switch. *Cell*, **96**, 341-352.
- Janoff, A. (1985) Elastases and emphysema. Current assessment of the protease-antiprotease hypothesis. *Am Rev Respir Dis*, **132**, 417-433.
- Janoff, A. and Scherer, J. (1968) Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*, **128**, 1137-1155.
- Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W. and Kjeldgaard. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallogr A*, **47 ( Pt 2)**, 110-119.
- Kabsch, W. and Sander, C. (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, **22**, 2577-2637.
- Katona, G., Wilmouth, R.C., Wright, P.A., Berglund, G.I., Hajdu, J., Neutze, R. and Schofield, C.J. (2002) X-ray structure of a serine protease acyl-enzyme complex at 0.95-Å resolution. *J Biol Chem*, **277**, 21962-21970.
- Kawabata, K., Suzuki, M., Sugitani, M., Imaki, K., Toda, M. and Miyamoto, T. (1991) ONO-5046, a novel inhibitor of human neutrophil elastase. *Biochem Biophys Res Commun*, **177**, 814-820.
- Kirkegaard, K. and Wang, J.C. (1985) Bacterial DNA topoisomerase I can relax positively supercoiled DNA containing a single-stranded loop. *J Mol Biol*, **185**, 625-637.
- Klebe, G. (2000) Recent developments in structure-based drug design. *J Mol Med*, **78**, 269-281.
- Klein, D.J., Schmeing, T.M., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2001) The kink-turn: a new RNA secondary structure motif. *Embo J*, **20**, 4214-4221.
- Koehler, C.M. (2004) The small Tim proteins and the twin Cx3C motif. *Trends Biochem Sci*, **29**, 1-4.
- Koehler, C.M., Merchant, S. and Schatz, G. (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem Sci*, **24**, 428-432.
- Krishna, S.S., Majumdar, I. and Grishin, N.V. (2003) Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res*, **31**, 532-550.
- Laskowski, M., Jr. and Kato, I. (1980) Protein inhibitors of proteinases. *Annu Rev Biochem*, **49**, 593-626.
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. and Thornton, J.M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, **26**, 283-291.
- Lestienne, P., Dimicoli, J.L. and Bieth, J. (1977) Trifluoroacetyl tripeptides as potent inhibitors of human leukocyte elastase. *J Biol Chem*, **252**, 5391-5393.
- Lestienne, P., Dimicoli, J.L., Renaud, A. and Bieth, J.G. (1979) Inhibition of human leukocyte elastase by acetyl and trifluoroacetyl oligopeptide chloromethyl ketones. *J Biol Chem*, **254**, 5219-5221.
- Leung, D., Abbenante, G. and Fairlie, D.P. (2000) Protease inhibitors: current status and future prospects. *J Med Chem*, **43**, 305-341.
- Li, Z., Mondragon, A., Hiasa, H., Marians, K.J. and DiGate, R.J. (2000) Identification of a unique domain essential for Escherichia coli DNA topoisomerase III-catalysed decatenation of replication intermediates. *Mol Microbiol*, **35**, 888-895.

- Lima, C.D., Wang, J.C. and Mondragon, A. (1993) Crystallization of a 67 kDa fragment of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J Mol Biol*, **232**, 1213-1216.
- Lima, C.D., Wang, J.C. and Mondragon, A. (1994) Three-dimensional structure of the 67K N-terminal fragment of E. coli DNA topoisomerase I. *Nature*, **367**, 138-146.
- Lopez-Garcia, P. and Forterre, P. (1997) DNA topology in hyperthermophilic archaea: reference states and their variation with growth phase, growth temperature, and temperature stresses. *Mol Microbiol*, **23**, 1267-1279.
- Lutz, T., Neupert, W. and Herrmann, J.M. (2003) Import of small Tim proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Embo J*, **22**, 4400-4408.
- Macdonald, S.J., Dowle, M.D., Harrison, L.A., Clarke, G.D., Inglis, G.G., Johnson, M.R., Shah, P., Smith, R.A., Amour, A., Fleetwood, G., Humphreys, D.C., Molloy, C.R., Dixon, M., Godward, R.E., Wonacott, A.J., Singh, O.M., Hodgson, S.T. and Hardy, G.W. (2002) Discovery of further pyrrolidine trans-lactams as inhibitors of human neutrophil elastase (HNE) with potential as development candidates and the crystal structure of HNE complexed with an inhibitor (GW475151). *J Med Chem*, **45**, 3878-3890.
- Macol, C.P., Tsuruta, H., Stec, B. and Kantrowitz, E.R. (2001) Direct structural evidence for a concerted allosteric transition in Escherichia coli aspartate transcarbamoylase. *Nat Struct Biol*, **8**, 423-426.
- Mainardi, C.L., Hasty, D.L., Seyer, J.M. and Kang, A.H. (1980) Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem*, **255**, 12006-12010.
- Maret, W. (2002) Optical methods for measuring zinc binding and release, zinc coordination environments in zinc finger proteins, and redox sensitivity and activity of zinc-bound thiols. *Methods Enzymol*, **348**, 230-237.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, **33**, 491-497.
- Mattos, C., Giammona, D.A., Petsko, G.A. and Ringe, D. (1995) Structural analysis of the active site of porcine pancreatic elastase based on the X-ray crystal structures of complexes with trifluoroacetyl-dipeptide-anilide inhibitors. *Biochemistry*, **34**, 3193-3203.
- Mattos, C., Rasmussen, B., Ding, X., Petsko, G.A. and Ringe, D. (1994) Analogous inhibitors of elastase do not always bind analogously. *Nat Struct Biol*, **1**, 55-58.
- Maxwell, A. (1997) DNA gyrase as a drug target. *Trends Microbiol*, **5**, 102-109.
- Maxwell, A. (1999) DNA gyrase as a drug target. *Biochem Soc Trans*, **27**, 48-53.
- McDonald, J.A. and Kelley, D.G. (1980) Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. *J Biol Chem*, **255**, 8848-8858.
- McGowan, S.E. and Murray, J.J. (1987) Direct effects of neutrophil oxidants on elastase-induced extracellular matrix proteolysis. *Am Rev Respir Dis*, **135**, 1286-1293.
- Merritt, T.A., Cochrane, C.G., Holcomb, K., Bohl, B., Hallman, M., Strayer, D., Edwards, D.K., 3rd and Gluck, L. (1983) Elastase and alpha 1-proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome. Role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest*, **72**, 656-666.
- Meyer, E.F., Jr., Radhakrishnan, R., Cole, G.M. and Presta, L.G. (1986) Structure of the product complex of acetyl-Ala-Pro-Ala with porcine pancreatic elastase at 1.65 Å resolution. *J Mol Biol*, **189**, 533-539.
- Min, J., Landry, J., Sternglanz, R. and Xu, R.M. (2001) Crystal structure of a SIR2 homolog-NAD complex. *Cell*, **105**, 269-279.
- Mondragon, A. and DiGate, R. (1999) The structure of Escherichia coli DNA topoisomerase III. *Structure Fold Des*, **7**, 1373-1383.
- Navia, M.A., McKeever, B.M., Springer, J.P., Lin, T.Y., Williams, H.R., Fluder, E.M., Dorn, C.P. and Hoogsteen, K. (1989) Structure of human neutrophil elastase in

- complex with a peptide chloromethyl ketone inhibitor at 1.84-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 7-11.
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, S.R., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., Haft, D.H., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Nelson, W.C., Ketchum, K.A., McDonald, L., Utterback, T.R., Malek, J.A., Linher, K.D., Garrett, M.M., Stewart, A.M., Cotton, M.D., Pratt, M.S., Phillips, C.A., Richardson, D., Heidelberg, J., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Eisen, J.A., White, O., Salzberg, S.L., Smith, H.O., Venter, J.C. and Fraser, C.M. (1999) Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature*, **399**, 323-329.
- Ohbayashi, H. (2002) Novel neutrophil elastase inhibitors as a treatment for neutrophil-predominant inflammatory lung diseases. *IDrugs*, **5**, 910-923.
- Ohmoto, K., Yamamoto, T., Okuma, M., Horiuchi, T., Imanishi, H., Odagaki, Y., Kawabata, K., Sekioka, T., Hirota, Y., Matsuoka, S., Nakai, H., Toda, M., Cheronis, J.C., Spruce, L.W., Gyorkos, A. and Wieczorek, M. (2001) Development of orally active nonpeptidic inhibitors of human neutrophil elastase. *J Med Chem*, **44**, 1268-1285.
- Otwinowski, Z. and Minor, W. (1997) *Processing of X-ray Diffraction Data Collected in Oscillation Mode*. Academic Press.
- Padovani, D., Mulliez, E. and Fontecave, M. (2001) Activation of class III ribonucleotide reductase by thioredoxin. *J Biol Chem*, **276**, 9587-9589.
- Paget, M.S., Bae, J.B., Hahn, M.Y., Li, W., Kleanthous, C., Roe, J.H. and Buttner, M.J. (2001) Mutational analysis of RsrA, a zinc-binding anti-sigma factor with a thiol-disulphide redox switch. *Mol Microbiol*, **39**, 1036-1047.
- Panjikar, S. and Tucker, P.A. (2002) Xenon derivatization of halide-soaked protein crystals. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **58**, 1413-1420.
- Perrakis, A., Harkiolaki, M., Wilson, K.S. and Lamzin, V.S. (2001) ARP/wARP and molecular replacement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 1445-1450.
- Perry, K. and Mondragon, A. (2003) Structure of a complex between *E. coli* DNA topoisomerase I and single-stranded DNA. *Structure (Camb)*, **11**, 1349-1358.
- Piccioni, P.D., Kramps, J.A., Rudolphus, A., Bulgheroni, A. and Luisetti, M. (1992) Proteinase/proteinase inhibitor imbalance in sputum sol phases from patients with chronic obstructive pulmonary disease. Suggestions for a key role played by antileukoprotease. *Chest*, **102**, 1470-1476.
- Pommier, Y. (1998) Diversity of DNA topoisomerases I and inhibitors. *Biochimie*, **80**, 255-270.
- Powers, J.C. (1983) Synthetic elastase inhibitors: prospects for use in the treatment of emphysema. *Am Rev Respir Dis*, **127**, S54-58.
- Qian, X., Gozani, S.N., Yoon, H., Jeon, C.J., Agarwal, K. and Weiss, M.A. (1993a) Novel zinc finger motif in the basal transcriptional machinery: three-dimensional NMR studies of the nucleic acid binding domain of transcriptional elongation factor TFIIS. *Biochemistry*, **32**, 9944-9959.
- Qian, X., Jeon, C., Yoon, H., Agarwal, K. and Weiss, M.A. (1993b) Structure of a new nucleic-acid-binding motif in eukaryotic transcriptional elongation factor TFIIS. *Nature*, **365**, 277-279.
- Renaud, A., Lestienne, P., Hughes, D.L., Bieth, J.G. and Dimicoli, J.L. (1983) Mapping of the S' subsites of porcine pancreatic and human leucocyte elastases. *J Biol Chem*, **258**, 8312-8316.
- Rodriguez, A.C. and Stock, D. (2002) Crystal structure of reverse gyrase: insights into the positive supercoiling of DNA. *Embo J*, **21**, 418-426.
- Rothenberg, M.L. (1997) Topoisomerase I inhibitors: review and update. *Ann Oncol*, **8**, 837-855.
- Saenger, W. (1984) *Principles of nucleic acid structure*. Springer, Berlin / Heidelberg / NewYork.

- Sandhaus, R.A. (1987) Elastase may play a central role in neutrophil migration through the connective tissue. In Taylor, J.C. and Mittmann, C. (eds.), *Pulmonary emphysema and proteolysis*. New York Academic Press, New York.
- Sawyer, L., Shotton, D.M., Campbell, J.W., Wendell, P.L., Muirhead, H. and Watson, H.C. (1978) The atomic structure of crystalline porcine pancreatic elastase at 2.5 Å resolution: comparisons with the structure of alpha-chymotrypsin. *J Mol Biol*, **118**, 137-208.
- Schechter, I. and Berger, A. (1967) On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, **27**, 157-162.
- Sinha, S., Watorek, W., Karr, S., Giles, J., Bode, W. and Travis, J. (1987) Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 2228-2232.
- Stewart, L., Redinbo, M.R., Qiu, X., Hol, W.G. and Champoux, J.J. (1998) A model for the mechanism of human topoisomerase I. *Science*, **279**, 1534-1541.
- Stryer, L. (2000) *Biochemistry*. Freeman W.H., New York.
- Takahashi, H., Nukiwa, T., Yoshimura, K., Quick, C.D., States, D.J., Holmes, M.D., Whang-Peng, J., Knutsen, T. and Crystal, R.G. (1988) Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem*, **263**, 14739-14747.
- Taylor, J.C. and Tloutan, J. (1978) Isoelectric focusing of human granulocyte lysosomal elastase in thin-layer polyacrylamide gels. *Anal Biochem*, **90**, 481-487.
- Tse, Y. and Wang, J.C. (1980) E. coli and M. luteus DNA topoisomerase I can catalyze catenation of decatenation of double-stranded DNA rings. *Cell*, **22**, 269-276.
- Tse-Dinh, Y.C. (1991) Zinc (II) coordination in Escherichia coli DNA topoisomerase I is required for cleavable complex formation with DNA. *J Biol Chem*, **266**, 14317-14320.
- Tse-Dinh, Y.C. and Beran-Steed, R.K. (1988) Escherichia coli DNA topoisomerase I is a zinc metalloprotein with three repetitive zinc-binding domains. *J Biol Chem*, **263**, 15857-15859.
- Veale, C.A., Bernstein, P.R., Bohnert, C.M., Brown, F.J., Bryant, C., Damewood, J.R., Jr., Earley, R., Feeney, S.W., Edwards, P.D., Gomes, B., Hulsizer, J.M., Kosmider, B.J., Krell, R.D., Moore, G., Salcedo, T.W., Shaw, A., Silberstein, D.S., Steelman, G.B., Stein, M., Strimpler, A., Thomas, R.M., Vacek, E.P., Williams, J.C., Wolanin, D.J. and Woolson, S. (1997) Orally active trifluoromethyl ketone inhibitors of human leukocyte elastase. *J Med Chem*, **40**, 3173-3181.
- Veale, C.A., Bernstein, P.R., Bryant, C., Ceccarelli, C., Damewood, J.R., Jr., Earley, R., Feeney, S.W., Gomes, B., Kosmider, B.J., Steelman, G.B. and et al. (1995) Nonpeptidic inhibitors of human leukocyte elastase. 5. Design, synthesis, and X-ray crystallography of a series of orally active 5-aminopyrimidin-6-one-containing trifluoromethyl ketones. *J Med Chem*, **38**, 98-108.
- Viard, T., Cossard, R., Duguet, M. and de La Tour, C.B. (2004) Thermotoga maritima-Escherichia coli chimeric topoisomerases. Answers about involvement of the carboxyl-terminal domain in DNA topoisomerase I-mediated catalysis. *J Biol Chem*, **279**, 30073-30080.
- Viard, T., Lamour, V., Duguet, M. and Bouthier de la Tour, C. (2001) Hyperthermophilic topoisomerase I from Thermotoga maritima. A very efficient enzyme that functions independently of zinc binding. *J Biol Chem*, **276**, 46495-46503.
- Wang, B., Jones, D.N., Kaine, B.P. and Weiss, M.A. (1998) High-resolution structure of an archaeal zinc ribbon defines a general architectural motif in eukaryotic RNA polymerases. *Structure*, **6**, 555-569.
- Wang, H.K., Morris-Natschke, S.L. and Lee, K.H. (1997) Recent advances in the discovery and development of topoisomerase inhibitors as antitumor agents. *Med Res Rev*, **17**, 367-425.

- Wang, J.C. (1971) Interaction between DNA and an Escherichia coli protein omega. *J Mol Biol*, **55**, 523-533.
- Wang, J.C. (1996) DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, **65**, 635-692.
- Wei, A.Z., Mayr, I. and Bode, W. (1988) The refined 2.3 Å crystal structure of human leukocyte elastase in a complex with a valine chloromethyl ketone inhibitor. *FEBS Lett*, **234**, 367-373.
- Werb, Z., Banda, M.J., McKerrow, J.H. and Sandhaus, R.A. (1982) Elastases and elastin degradation. *J Invest Dermatol*, **79 Suppl 1**, 154s-159s.
- World Health Report 2003WHO. (2003) World Health Report 2003. World Health Organisation, Geneva.
- Wilson, T.M., Chen, A.D. and Hsieh, T. (2000) Cloning and characterization of Drosophila topoisomerase IIIbeta. Relaxation of hypernegatively supercoiled DNA. *J Biol Chem*, **275**, 1533-1540.
- Winn, M.D., Isupov, M.N. and Murshudov, G.N. (2001) Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **57**, 122-133.
- Wurtele, M., Hahn, M., Hilpert, K. and Hohne, W. (2000) Atomic resolution structure of native porcine pancreatic elastase at 1.1 Å. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, **56 ( Pt 4)**, 520-523.
- Zhu, C.X., Qi, H.Y. and Tse-Dinh, Y.C. (1995) Mutation in Cys662 of Escherichia coli DNA topoisomerase I confers temperature sensitivity and change in DNA cleavage selectivity. *J Mol Biol*, **250**, 609-616.
- Zhu, C.X., Roche, C.J. and Tse-Dinh, Y.C. (1997) Effect of Mg(II) binding on the structure and activity of Escherichia coli DNA topoisomerase I. *J Biol Chem*, **272**, 16206-16210.
- Zhu, C.X. and Tse-Dinh, Y.C. (2000) The acidic triad conserved in type IA DNA topoisomerases is required for binding of Mg(II) and subsequent conformational change. *J Biol Chem*, **275**, 5318-5322.
- Zhu, W., Zeng, Q., Colangelo, C.M., Lewis, M., Summers, M.F. and Scott, R.A. (1996) The N-terminal domain of TFIIIB from Pyrococcus furiosus forms a zinc ribbon. *Nat Struct Biol*, **3**, 122-124.

### A5 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Typische Vorgehensweise beim strukturbasierten Wirkstoffdesign.....	3
<b>Abb. 1.2:</b> Ausbildung einer rechtsgängigen DNA-Superhelix .....	5
<b>Abb. 1.3:</b> Modell des Reaktionsmechanismus der <i>E. coli</i> Topoisomerase I.....	10
<b>Abb. 1.4:</b> Katalytischer Mechanismus der Serinproteasen .....	17
<b>Abb. 1.5:</b> Wechselwirkungen zwischen Elastase und synthetischen Inhibitoren. ....	21
<b>Abb. 1.6:</b> Chemische Struktur des Inhibitors WO24700 .....	24
<b>Abb. 2.1:</b> Verlauf der Reinigung der TmTop I .....	37
<b>Abb. 3.1:</b> Klonierung des topA-Gens aus <i>T. maritima</i> .....	54
<b>Abb. 3.2:</b> Aminosäuresequenz des rekombinanten TmTop I-Proteins.....	55
<b>Abb. 3.3:</b> Ionenaustauschchromatographie der TmTop I .....	56
<b>Abb. 3.4:</b> Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration der TmTop I.....	57
<b>Abb. 3.5:</b> Übersicht über die Reinigung rekombinanter TmTop I .....	59
<b>Abb. 3.6:</b> DNA-Relaxationsaktivität von Topoisomerasen I.....	60
<b>Abb. 3.7:</b> Optimierung der Kristallisationsbedingungen .....	62
<b>Abb. 3.8:</b> Diffraktionsaufnahmen der triklinen Kristallform der TmTop I.....	63
<b>Abb. 3.9:</b> Röntgenfluoreszenzspektrum eines monoklinen TmTop I-Kristalls.....	64
<b>Abb. 3.10:</b> Verbesserung der Elektronendichtekarten während Modellbau und Verfeinerung .....	71
<b>Abb. 3.11:</b> Ramachandran-Plots der Strukturen der triklinen und monoklinen Kristallformen der TmTop I.....	75
<b>Abb. 3.12:</b> Übersicht über die Struktur der TmTop I.....	78
<b>Abb. 3.13:</b> Stereodarstellung des aktiven Zentrums der TmTop I.....	80
<b>Abb. 3.14:</b> Molekulare Oberfläche von TmTop I .....	83
<b>Abb. 3.15:</b> Organisation der $\beta$ -Faltblätter in Domäne V .....	84
<b>Abb. 3.16:</b> Darstellung typischer <i>zinc ribbon</i> -Motive aus fünf unterschiedlichen Proteinen.....	87
<b>Abb. 3.17:</b> Ausbildung von Disulfidbrücken innerhalb des <i>zinc ribbon</i> -Motivs in Domäne V.....	88
<b>Abb. 3.18:</b> DNA-Bindespalte der TmTop I .....	91
<b>Abb. 3.19:</b> Modell für die Bindung von einzelsträngiger DNA durch TmTop I.....	93
<b>Abb. 3.20:</b> Strukturbasiertes Sequenzalignment von TmTop I und EcTop I.....	97

---

<b>Abb. 3.21:</b> SDS-Gelelektrophorese der HNE .....	99
<b>Abb. 3.22:</b> MALDI-Massenspektrum der HNE .....	100
<b>Abb. 3.23:</b> Kristalle der HNE .....	101
<b>Abb. 3.24:</b> Differenz-Elektronendichtekarten von WO24700 im aktiven Zentrum der HNE .....	109
<b>Abb. 3.25:</b> Differenz-Elektronendichtekarten von TFA-Val-Tyr-Val-OH im aktiven Zentrum der HNE .....	112
<b>Abb. 3.26:</b> Ramachandran-Plots der verschiedenen HNE-Strukturen.....	113
<b>Abb. 3.27:</b> Aminosäuresequenz der HNE.....	116
<b>Abb. 3.28:</b> Überblick des Inhaltes der asymmetrischen Einheiten der unterschiedlichen Kristallformen der HNE .....	118
<b>Abb. 3.29:</b> Interaktionen der Bindetaschen von HNE mit TFA-Val-Tyr-Val-OH .....	123
<b>Abb. 3.30:</b> Interaktionen der Bindetaschen von HNE mit WO24700 .....	127
<b>Abb. 3.31:</b> Oberflächendarstellung der Bindung von WO24700 in die Bindetaschen S1 und S2 der HNE .....	129
<b>Abb. 3.32:</b> Wasserstoffbrückenmuster innerhalb des flexiblen Loops (Asp95 - Leu 99B) der HNE in Apo-Struktur und im Komplex mit WO24700 .....	131
<b>Abb. 3.33:</b> Vergleich der Region um das aktive Zentrum in HNE-WO24700-Komplex und Apo-Enzym.....	130
<b>Abb. 3.34:</b> Vergleich der S4-Bindetasche in HNE-WO24700-Komplex und Apo-Enzym .....	133
<b>Abb. 3.35:</b> Vergleich von HNE-Komplexen der Inhibitoren WO24700 und TFA-Val-Tyr-Val-OH mit publizierten HNE-Inhibitorkomplexen .....	135
<b>Abb. 3.36.:</b> Konformation des Loops mit den Aminosäuren Asp95 - Leu 99B in den unterschiedlichen Strukturen der HNE .....	138

## A6 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 2.1:</b> Verwendete Geräte.....	27
<b>Tabelle 2.2:</b> Sonstige Materialien.....	28
<b>Tabelle 2.3:</b> Computerprogramme.....	29
<b>Tabelle 2.4:</b> Vorbereitung des Expressionsvektors.....	32
<b>Tabelle 2.5:</b> Amplifikation des <i>topA</i> -Gens und Ligation des <i>topA</i> -Plasmids.....	33
<b>Tabelle 2.6:</b> Restriktionsanalyse des <i>topA</i> -Plasmids.....	34
<b>Tabelle 2.7:</b> Primer zur Sequenzierung des <i>topA</i> -Plasmids.....	34
<b>Tabelle 2.8:</b> DNA-Relaxationstest der TmTop I.....	41
<b>Tabelle 2.9:</b> Übersicht über die verwendeten Kristallisations-Screens.....	43
<b>Tabelle 2.10:</b> Bedingung zur Herstellung des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes.....	44
<b>Tabelle 2.11:</b> Messparameter für Datensätze der TmTop I.....	46
<b>Tabelle 2.12:</b> Messparameter des Datensatzes des HNE-Apo-Enzyms.....	46
<b>Tabelle 2.13:</b> Messparameter des Datensatzes des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes.....	47
<b>Tabelle 2.14:</b> Messparameter des Datensatzes des HNE-WO24700-Komplexes.....	47
<b>Tabelle 3.1:</b> Retentionsvolumina der Gelfiltrationschromatographie.....	58
<b>Tabelle 3.2:</b> Überblick über optimierte Kristallisationsbedingungen der TmTop I...	62
<b>Tabelle 3.3:</b> Statistische Parameter der gemessenen Diffraktionsdatensätze der TmTop I.....	65
<b>Tabelle 3.4:</b> Inhalt der asymmetrischen Einheiten der TmTop I Kristalle.....	66
<b>Tabelle 3.5:</b> Maxima der Selbstrotation der triklinen Kristallform der TmTop I.....	66
<b>Tabelle 3.6:</b> Maxima der Pattersonfunktion der monoklinen Kristallform der TmTop I.....	67
<b>Tabelle 3.7:</b> Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz der triklinen Kristallform der TmTop I.....	69
<b>Tabelle 3.8:</b> Verfeinerung der TmTop I-Struktur, triklone Raumgruppe.....	71
<b>Tabelle 3.9</b> Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz der monoklinen Kristallform der TmTop I.....	72
<b>Tabelle 3.10:</b> Verfeinerung der TmTop I-Struktur, monokline Raumgruppe.....	72
<b>Tabelle 3.11:</b> Statistische Parameter der verfeinerten TmTop I-Strukturen.....	74



---

<b>Tabelle 3.12:</b> Überblick über optimierte Kristallisationsbedingungen des HNE-Apo-Enzyms.....	102
<b>Tabelle 3.13:</b> Überblick über optimierte Kristallisationsbedingung des HNE-WO24700 Komplexes.....	103
<b>Tabelle 3.14:</b> Statistische Parameter der gemessenen Diffraktionsdatensätze der HNE.....	104
<b>Tabelle 3.15:</b> Inhalt der asymmetrischen Einheiten der HNE-Kristalle.....	105
<b>Tabelle 3.16:</b> Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz des HNE-Apo-Enzyms.....	106
<b>Tabelle 3.17:</b> Verfeinerung der HNE-Apo-Struktur.....	107
<b>Tabelle 3.18:</b> Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz des HNE-WO24700-Komplexes.....	108
<b>Tabelle 3.19:</b> Verfeinerung des HNE-WO24700-Komplexes.....	108
<b>Tabelle 3.20:</b> Ergebnisse der Rechnungen zum Molekularer Ersatz des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes.....	110
<b>Tabelle 3.21:</b> Verfeinerung des HNE-TFA-Val-Tyr-Val-OH-Komplexes.....	111
<b>Tabelle 3.22:</b> Statistische Parameter der verfeinerten HNE -Strukturen.....	113

### A7 Lebenslauf

#### Persönliche Daten

Name: Guido Hansen  
Geburtsdatum: 22. Juli 1974  
Geburtsort: Dorsten  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

#### Schulbildung

August 1985 – Juli 1991 Städtische Realschule Wesel-Mitte, Wesel  
September 1991 – Mai 1994 St. Ursula Gymnasium, Dorsten  
Abitur Note: 1,8

#### Studium

WS 1995 – WS 2001 Biologie (Diplom), Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln

Diplomarbeit: „Untersuchung der Rolle des ActA-Proteins von *Listeria monocytogenes* bei der Aufnahme in Wirtszellen“

Studienabschluss: Diplom-Biologe  
Note : sehr gut

#### Promotion

WS 2001 - heute Biochemie, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Universität zu Köln  
BayerHealthCare AG, Wuppertal

Promotionsarbeit: „Strukturbasiertes Wirkstoffdesign am Beispiel der Topoisomerase I aus *Thermotoga maritima* und der humanen neutrophilen Elastase“

## A8 Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat, dass sie – abgesehen von oben (Abschnitt A.3) angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Dietmar Schomburg betreut worden.

---

(Guido Hansen)