

Gutachter:

- | | |
|------------------------------|--|
| 1. Prof. Dr. Frank-D. Böhmer | Friedrich-Schiller-Universität Jena |
| 2. Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld | Universität zu Lübeck |
| 3. Prof. Dr. Norbert Sträter | Universität Leipzig |
| 4. Prof. Dr. Milton T. Stubs | Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg |

Termin der Doktorprüfung: 10.10.2007

Termin der Verteidigung: 19.05.2008

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bedeutung der Strukturaufklärung	1
1.2	Die Enzymfamilie der Transglutaminasen	2
1.3	Blutgerinnungsfaktor XIII	3
1.3.1	Genetik	5
1.3.2	Aktivierung und Reaktionsmechanismus	6
1.3.3	Arbeiten zur Kristallisation von Faktor XIII	9
1.3.4	Struktur	9
1.4	Ziel dieser Arbeit	13
2	Materialien	14
2.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.2	Chemikalien und Enzyme	14
2.3	Puffer und Stammlösungen	15
2.4	Kits und Assays	15
3	Methoden	16
3.1	SDS-PAGE	16
3.2	Expression in <i>E. coli</i>	16
3.3	Aufreinigung von Faktor XIII	16
3.4	Western Blot	17
3.5	Festphasensynthese von Peptiden nach Merrifield	17
3.6	Reinigung der synthetisierten Peptide mittels HPLC	18
3.7	Massenspektrometrie	18
3.8	Aktivitätsbestimmung von Thrombin	19
3.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	19
3.10	Aufkonzentration von FXIIIa-Lösungen	20
3.11	Aktivitätsbestimmung von Faktor XIII mit dem Berichrom Assay	20
3.12	Theoretische Grundlagen	21
3.12.1	Möglichkeiten der Beschreibung der thermischen Bewegung	21
3.12.2	Der anomale Effekt	23
3.12.3	Qualitätsindikatoren einer Struktur	24
3.13	Kristallisation von Faktor XIII	25
3.13.1	Kristallisation im hängenden Tropfen	25
3.13.2	Kristallisation über Agarosegel	26
3.14	Abkühlen der Proteinkristalle auf 100 K	26
3.15	Kristallvermessung und Datenprozessierung	27
3.15.1	SCALA	27
3.15.2	TRUNCATE	28
3.15.3	AMORE	28
3.15.4	REFMAC	28
3.15.5	ESCET	29

3.15.6	Sonstige, häufig verwendete Programme	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Die monokline Kristallform	31
4.1.1	Die native Faktor XIII-Struktur	32
4.1.2	Faktor XIII mit Calcium — eine hochaufgelöste Struktur . .	35
4.1.3	Verwendung anomaler Daten zur exakten Quantifizierung der gebundenen Calciumionen	39
4.1.4	FXIII-Struktur mit langer Zellachse	44
4.1.5	Kristallisation in der Schwerelosigkeit	46
4.2	Die orthorhombische Kristallform	48
4.2.1	Die native FXIII-Struktur	49
4.2.2	Der Komplex mit Calcium	51
4.3	Versuch der Kristallisation der aktiven Form	53
4.3.1	Aktivierung von FXIII und Aufkonzentration	54
4.3.2	Kristallisationsversuche mit und ohne Inhibitoren	65
4.3.3	Versuche zur Aufkonzentration und Kristallisation ohne CHAPS	67
4.3.4	Synthese von inhibitorischen Peptiden	68
4.3.5	Überprüfung der inhibitorischen Wirkung der Peptide	70
4.4	Versuch der Kristallisation des Plasmafaktor XIII	71
5	Diskussion	73
5.1	Unterschiede zu den bekannten FXIII-Strukturen	73
5.2	Vergleich der unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen	76
5.3	Vergleich der Faktor XIII-Strukturen	77
5.3.1	Kristallpackung	77
5.3.2	Analyse der Domänen-Beweglichkeit	80
5.3.3	Domänenverlagerungen	83
5.3.4	Strukturvergleich mit dem Programm ESCET	86
5.4	Inhibitorische Wirkung der synthetisierten Peptide	94
5.5	Die aktive Konformation von Faktor XIII	97
5.6	Ausblick auf weiterführende Arbeiten	100
6	Zusammenfassung	101
7	Anhang	103
	Abkürzungen und Synonyme	113
	Danksagung	114
	Ehrenwörtliche Erklärung	115

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Bedeutung der Strukturaufklärung

Eine vollständige biochemische Charakterisierung zur Beschreibung eines Proteins ist nicht ausreichend, da bereits bei kleinen Abweichungen, wie z. B. einer Punktmutation, es in der Regel nicht möglich ist im Voraus zu sagen, ob und wie sich die Eigenschaften dadurch ändern. Das Protein wäre einfach eine so genannte Black Box — man kann die Eigenschaften bestimmen, ohne die Hintergründe dafür zu kennen. Erst mit der Struktur in Kombination mit den biochemischen Daten kann man die komplexen Zusammenhänge erkennen und Aussagen über noch nicht bekannte Eigenschaften treffen. Nur die Einheit von Struktur und biochemischen Eigenschaften ermöglicht das Verstehen komplexer Zusammenhänge.

Zur Strukturaufklärung stehen derzeit drei große Methoden mit diversen Vor- und Nachteilen zur Verfügung. Dank der großen Fortschritte in den letzten Jahren wäre zunächst die Kryoelektronenmikroskopie zu nennen. Bei dieser Methode wird die Probe mit einem intensiven Elektronenstrahl vermessen. Im Idealfall ist dies ein zweidimensionaler Kristall des zu untersuchenden Objekts. Bedingt durch die starke Wechselwirkung zwischen Elektronenstrahl und Protein, wird die Probe im Laufe der Messung zerstört. Um diesen Prozess zu verlangsamen und hochaufgelöste Bilder überhaupt erst zu ermöglichen, muss die Probe ständig gekühlt werden, wie es bereits dem Namen der Methode zu entnehmen ist. Die erhaltenen Bilder werden anschließend kombiniert, und man erhält am Ende ein dreidimensionales Bild der Proteinoberfläche. Es ist leider nur ein Bild der Oberfläche, da die erreichte Auflösung unter günstigen Bedingungen nur bei ca. 5 \AA^1 liegt. Damit können jedoch einzelne Strukturelemente, wie z. B. eine α -Helix, normalerweise nicht aufgelöst werden. Trotzdem leistet diese Methode einen wichtigen Beitrag, da auch schwer kristallisierbare, große Proteinkomplexe beobachtet werden können. So verdankt die Wissenschaft der Elektronenmikroskopie die ersten detaillierten Bilder vom Ribosom.

Eine weitere Methode zur Strukturaufklärung ist die NMR-Spektroskopie. Hier nutzt man die Ausrichtung des Kernspins in einem starken Magnetfeld zur Bestimmung der relativen Abstände der Atome untereinander. Dafür werden Atome mit einem Kernspin ungleich Null benötigt. Das sind Kerne mit einer ungeraden Anzahl an Protonen oder Kerne mit gerader Protonen-, aber ungerader Neutronenzahl². Nur solche Kerne besitzen einen Kernspin und können deshalb in der

¹In dieser Arbeit werden alle Angaben dieser Art, wie in der Strukturbiologie üblich, in \AA angegeben, wobei $1 \text{ \AA} = 0,1 \text{ nm}$ entspricht. Diese Maßeinheit wurde nach dem schwedischen Physiker Anders Jon Ångström (1814–1874) benannt, welcher sich große Verdienste auf dem Gebiet der Spektroskopie erwarb.

²Als Beispiele seien ^1H , ^{13}C und ^{15}N genannt.

NMR-Spektroskopie vermessen werden. Da jedes Atom Informationen über seine Umgebung liefert, können derzeit aufgrund der Komplexität nur Proteine bis ca. 30 kDa mittels NMR untersucht werden, was einen klaren Nachteil gegenüber den anderen Techniken zur Strukturaufklärung darstellt. Zusätzlich sind ab einem gewissen Molekulargewicht meist ein anderes Lösungsmittel als Wasser und verschiedene Derivate mit unterschiedlichen Isotopenmarkierungen nötig, da anderenfalls eine Interpretation der Daten unmöglich ist. Ein Vorteil dieser Methode ist die nahezu wechselwirkungsfreie Datensammlung, die die NMR in abgewandelter Form als Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) in der Medizin zur Anwendung kommen lässt. Eine Kristallisation der Probe ist weder notwendig noch erwünscht.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe der Röntgenkristallographie³ erhalten. Diese Methode darf ohne Übertreibung als die wichtigste Methode zur Strukturaufklärung bezeichnet werden. Jedes Jahr werden auf diese Weise eine Vielzahl neuer Strukturen publiziert, deren Anzahl die der anderen Methoden zusammengenommen um ein Vielfaches übertrifft. Auch die Güte dieser Strukturen ist in der Regel mit denen der anderen Techniken nicht vergleichbar. Zwar liefert auch die NMR gut definierte Strukturen, die aber in Bezug auf Qualität nicht mit hochaufgelösten Kristallstrukturen⁴ konkurrieren können [1]. Als Untersuchungsobjekt dient der Röntgenkristallographie ein Proteinkristall, welcher im Röntgenstrahl ein charakteristisches Streubild liefert. Aus den gemessenen Streubildern kann schließlich die genaue Position jedes einzelnen Atoms berechnet werden. Leider ist ein Proteinkristall ausreichender Güte unbedingte Voraussetzung für diese Methode, was die Untersuchung großer Komplexe sehr schwierig gestaltet. Seit der erfolgreichen Kristallisation des Ribosoms [2, 3] ist aber bewiesen, dass es in Bezug auf Größe praktisch kein Limit für diese Methode gibt.

1.2 Die Enzymfamilie der Transglutaminasen

Die kleine Gruppe der Transglutaminasen ist relativ unbekannt. Ein Grund dafür mag das Fehlen dieser Enzyme in den großen, recht gut verstandenen und ausgiebig gelehrteten Prozessen wie z. B. DNA-Replikation und Proteinbiosynthese sein. Den wohl bekanntesten Vertreter dieser Enzymfamilie findet man in der Blutgerinnungskaskade, wo er für die Quervernetzung und damit für die Stabilisierung des Gerinnsels verantwortlich ist. Die beim Faktor XIII gefundene Funktion, das Verknüpfen des γ -Kohlenstoffatoms des Glutamins mit der am ϵ -Kohlenstoffatom des Lysins befindlichen Aminogruppe, war dann auch namensgebend für die Transglutaminasen: Es wird ein Glutamin auf ein anderes Protein übertragen. Es dauerte von der Entdeckung der ersten Transglutaminase im Jahre 1948 durch Laki und Lorand [4] bis zum Jahr 1957, bevor eine weitere Transglutaminase durch Sarkar *et al.* [5] beschrieben wurde. Inzwischen sind u. a. durch das Humane-Genom-Projekt zahlreiche Mitglieder dieser Enzymfamilie bekannt. Tabelle 1.1 soll eine Übersicht über die derzeit bekannten, humanen Transglutaminasen und deren Funktion geben, sofern diese bekannt ist.

Von besonderem Interesse ist derzeit die erstmals 1957 von der Gruppe um H. Waelsch beschriebene Gewebstransglutaminase (tissue transglutaminase, TGase2) untersucht [5]. Diese wird von vielen Zelltypen gebildet und lässt sich deshalb in verschiedenen Geweben finden. Die physiologische Funktion ist noch nicht vollständig verstanden, aber es gilt als sicher, dass die Gewebstransglutaminase u. a.

³Röntgenstrahlung ist elektromagnetische Strahlung mit einer Wellenlänge von 1.0 nm bis 0.01 nm. Sie wurde nach ihrem Entdecker W.C. Röntgen benannt, der dafür 1901 den erstmals verliehenen Physik-Nobelpreis erhielt.

⁴Das Wort Kristallstrukturen wird oft für Proteinstrukturen, welche mit der Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt wurden, verwendet.

Faktor XIII	Blutgerinnung, Struktur bekannt
Keratinozytentransglutaminase, TG1	Vernetzung von Strukturproteinen
Gewebstransglutaminase, TG2	Funktion nicht eindeutig bekannt, Struktur bekannt (PDB-Code 1KV3)
Epidermistransglutaminase, TG3	bei der Epidermisentwicklung für die Vernetzung von Strukturproteinen verantwortlich, Struktur bekannt (1L9M)
Prostatatransglutaminase, TG4	in die Spermabildung involviert
TG5	unbekannte Funktion
TG6	unbekannte Funktion
TG7	unbekannte Funktion
epb42	inaktives Protein, hat keine enzymatische Aktivität

Tabelle 1.1: Aufzählung der bekannten humanen Transglutaminasen.

eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der extrazellulären Matrix, der Apoptose und in diversen Krankheiten, wie z. B. bei der Zöliakie spielt. Ein Novum unter den Transglutaminasen ist die Eigenschaft der Gewebstransglutaminase GTP zu binden und hydrolysieren zu können. Damit kann dieses Enzym sowohl G-Protein in der Signaltransduktion als auch Transglutaminase sein. Dabei spielt Calcium eine wichtige Rolle als Schalter zwischen den beiden Funktionen.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Transglutaminasen (siehe Abb. 7.1 auf der Seite 104 und Abb. 7.2 auf Seite 105), fällt die starke Ähnlichkeit sofort auf.⁵ Es ist daher auch nicht verwunderlich, dass die inzwischen bekannten Strukturen von TGase2 [6, 7] und TGase3 [8] der von Faktor XIII sehr ähnlich sind. Wie in Abbildung 1.1 klar zu erkennen ist, besteht die Struktur stets aus vier Domänen, wobei das aktive Zentrum in Domäne 2 lokalisiert ist. Interessanterweise besitzt aber nur Faktor XIII ein Aktivierungspeptid.

Der Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle erwähnt, dass auch die Strukturen von drei nicht-humanen Transglutaminasen bekannt sind. Es sind dies eine Fisch-Transglutaminase [9], eine bakterielle Transglutaminase [10] und eine Domäne eines Enzyms aus *E.coli* [11]. Allerdings weist nur das letztgenannte Beispiel eine völlig andere Struktur auf. In dieser Arbeit wurde fast ausschließlich mit Faktor XIII gearbeitet, weshalb im Folgenden auf diesen etwas ausführlicher eingegangen werden soll.

1.3 Blutgerinnungsfaktor XIII

Die ungarischen Forscher K. Laki und L. Lorand beschrieben in einem 1948 in *Science* veröffentlichten Beitrag das Phänomen, dass gereinigtes Fibrinogen mit gereinigtem Thrombin zu einem Gerinnsel reagiert, das sich im Gegensatz zu einem im Blutplasma gebildeten Gerinnsel in 60 % Harnstoff auflösen lässt [4]. Erst der Zusatz von Calciumionen und einer thermolabilen Serumkomponente zu der Fibrinogen-Thrombin-Lösung ließ auch hier ein unlösliches Gerinnsel entstehen. Das nach sei-

⁵Bei dem für die hier vorliegende Arbeit verwendeten Faktor XIII handelt es sich um eine besondere Variation. An Position 651 befindet sich anstatt eines Glutamins eine Glutaminsäure.

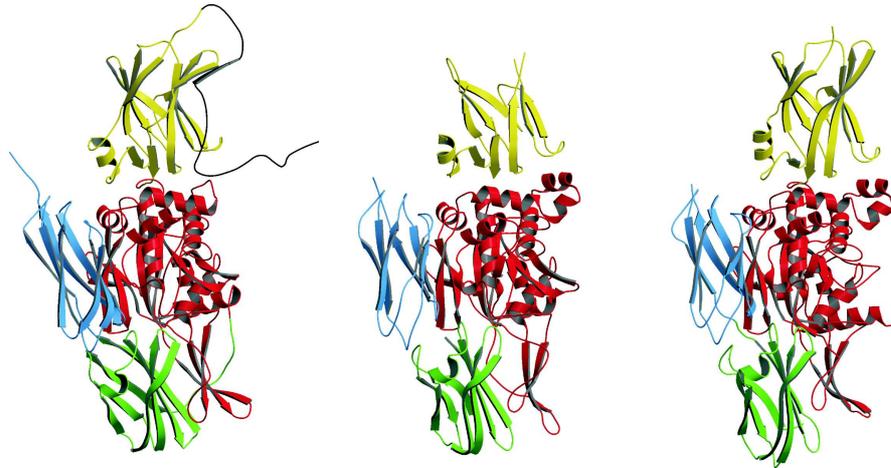


Abbildung 1.1: Vergleich der Strukturen von Faktor XIII (PDB-Code 1F13, links), TGase2 (1KV3, mitte) und TGase3 (1L9M, rechts). Die vier Domänen sind jeweils in den gleichen Farben und das Aktivierungspeptid des Faktor XIII in schwarz dargestellt.

ner Funktion „Fibrin-stabilisierender Faktor“ und zum Teil auch nach seinen Entdeckern „Laki-Lorand-Faktor“ bezeichnete Enzym wurde 1963 nach dem Erkennen seiner klinischen Bedeutung in den Kreis der Blutgerinnungsfaktoren aufgenommen und in „Faktor XIII“ umbenannt. Der Blutgerinnungsfaktor XIII ist eine Transglutaminase, d. h. er generiert eine kovalente γ -Glutamin- ϵ -Lysin-Bindung (Isopeptidbindung) zwischen den α - und γ -Ketten des Fibrins, was zu einer Stabilisierung des Gerinnsels beiträgt (siehe Abb. 1.2). Neben dem Vernetzen der Fibrinketten ist Faktor XIII auch für die Bindung von α_2 -Plasmininhibitor (α_2 -PI oder auch α_2 -Antiplasmin genannt) an die Fibrin- α -Ketten verantwortlich und erhöht damit die Fibrinolyseresistenz. Des Weiteren wird eine Bedeutung von Faktor XIII bei der Befestigung des Blutgerinnsels an der Gefäßwand durch Quervernetzung von Fibrin mit Fibronectin, Fibrin mit von-Willebrand-Faktor, von-Willebrand-Faktor mit Kollagen, Fibronectin mit Kollagen und Vinkulin mit Fibrin beschrieben [12].

Der extrazellulär im Blutplasma als Zymogen vorliegende Blutgerinnungsfaktor XIII (pFXIII) ist ein A_2B_2 -Heterotetramer, dessen Untereinheiten durch nicht-kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten werden. Dieses Zymogen hat eine Molmasse von etwa 340 kDa. Die A- und B-Untereinheiten sind Produkte verschiedener Gene und weisen keine erkennbare Homologie zueinander auf. Über die Regulation der Genexpression sowie die Sekretion und Assemblierung der Untereinheiten ist bisher nur wenig bekannt. Die gesamte katalytische Aktivität ist auf der A-Untereinheit lokalisiert. Gesicherte Erkenntnisse über die Funktion der B-Untereinheit liegen noch nicht vor. Sie wird aber mit der Stabilisierung und Regulation der Aktivierung in Verbindung gebracht. Die Konzentrationen im Blutplasma werden mit 0,13–0,16 μ M für die A-Untereinheit und 0,26–0,28 μ M für die B-Untereinheit angegeben [13]. Dabei weisen Frauen eine höhere Konzentration dieser Proteine im Blut auf als Männer. Mit dem Alter steigt bei beiden die Konzentration von pFXIII leicht an, dies geht aber mit einer verminderten Aktivität einher [14]. Aufgrund des Überschusses an B-Untereinheiten liegen alle A-Untereinheiten als oben beschriebenes Heterotetramer vor, während etwa die Hälfte aller B-Ketten unkomplexiert im Blut nachweisbar sind.

Intrazellulär ist die A-Untereinheit u. a. in Thrombozyten, Megakaryozyten und Monozyten zu finden. Dort liegt sie als Homodimer (A_2) vor, ist identisch mit der im Plasma vorkommenden A-Polypeptidkette und wird in der Regel als zellulärer Faktor XIII (cFXIII) bezeichnet. Im menschlichen Blut sind 50 % der A-Untereinheiten als Homodimere in den Thrombozyten lokalisiert.

Untersuchungen nach Knochenmark-Transplantationen haben gezeigt, dass die A-Ketten primär in Monozyten und Megakaryozyten synthetisiert werden. Es konnte auch in isolierten menschlichen Monozyten und in der Monozytenzelllinie U937 für die A-Ketten codierende mRNA gefunden werden [15]. Jedoch scheint es auch in der Leber zur Produktion von A-Untereinheiten zu kommen. So wurde die entsprechende mRNA in Proben menschlicher Leber und Faktor XIII A-Untereinheit-Antigene in Hepatozyten und zwei Hepatomazelllinien (HepG2 und PLC/PRF/5) nachgewiesen [16, 17]. Anscheinend sind einzelne Hepatozyten und Kupffer-Zellen in der Lage, im kleinen Umfang die A-Kette zu synthetisieren [18, 19]. Unbestritten ist jedoch die Tatsache, dass der weitaus größte Teil der A-Untereinheiten im Knochenmark gebildet wird.

Untersuchungen an Lebertransplantationspatienten haben eindeutig die Leber als den Synthesort der B-Untereinheit identifiziert. Die Experimente von Nagy *et al.* [17] an der HepG2 Zelllinie unterstützen diese Ergebnisse. Patienten mit chronischem Mangel an Faktor XIII A-Untereinheit weisen üblicherweise gleichzeitig eine reduzierte Konzentration der B-Untereinheit auf. Dies deutet auf eine Regulation der Halbwertszeit oder der Synthese der B-Untereinheit durch die A-Untereinheit hin; der Mechanismus ist aber noch unklar. Möglicherweise handelt es sich hierbei jedoch nur um eine Autoregulation der B-Untereinheit, da die Konzentration an freien B-Untereinheiten im Plasma immer konstant bleibt [13]. In einer aktuellen Studie wird von einem B-Ketten-Mangel berichtet, bei dem trotz eines normalen Spiegels an A-Untereinheiten in den Thrombozyten die Halbwertszeit von verabreichten A-Ketten im Plasma deutlich verringert war [20]. Diese Ergebnisse bestätigen den vermuteten Einfluss der B-Untereinheit auf die Stabilität der A-Ketten. Da A- und B-Untereinheit getrennt voneinander synthetisiert werden, müssen sie eine hohe Affinität zueinander aufweisen.

1.3.1 Genetik

Das auf Chromosom 6p24–25 lokalisierte und über 160 kb große Gen für die A-Untereinheit besteht aus 15 Exons. Die in pFXIII und cFXIII identischen A-Ketten stammen beide von diesem Gen. Exon 1, ein Teil von Exon 2 sowie große Bereiche von Exon 15 sind nichtcodierende Sequenzen. Die Initiationsstelle der Transkription ist unbekannt; es kommen dafür drei verschiedene Sequenzen 170, 150 bzw. 40 Basenpaare stromaufwärts vom ersten Startcodon in Frage. Auch die Faktoren, die die Transkription der A-Kette regulieren, sind bisher unbekannt. Die komplette mRNA ist 3,9 kb groß und umfasst 2 196 codierende Nukleotide. Zusätzlich befinden sich 84 Nukleotide im 5'- sowie 1,6 kb im 3'-nichttranslatierten Bereich. Nach Abspaltung des N-terminalen Methionins besteht die A-Kette aus 731 Aminosäuren, wobei das N-terminale Serin eine Acetylierung trägt, und besitzt eine Molmasse von 83 150 Da. Es existieren sechs potentielle N-Glykosylierungstellen, obwohl bisher an keiner dieser Asparagine Glykosylierungen gefunden worden sind. Außerdem sind neun Cysteine in der Sequenz enthalten, von denen aber keines in eine Disulfidbrücke involviert ist. Es wurden mehrere Polymorphismen identifiziert. Der wohl bekannteste ist hierbei der V34L-Polymorphismus, welcher bei einem Viertel aller untersuchten, hellhäutigen Menschen anzutreffen ist [21, 22]. Durch den Austausch von Valin 34 durch Leucin erfolgt die Aktivierung durch Thrombin schneller [23, 24]. Zusätzlich weist das aktivierte Enzym eine erhöhte Aktivität auf [25, 26]. Trotz der bekannten Struktur kann leider keine endgültige Aussage über die strukturel-

len Ursachen hierfür gegeben werden. Genauso wenig ist über den bewiesenen Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und dem anscheinend verminderten Herzinfarktrisiko, der erhöhten Gefahr von Hirnblutungen und dem verminderten Risiko von Hirninfarkten der betroffenen Personen bekannt [27, 28, 29].

Der Mechanismus der Sekretion der A-Ketten ins Plasma ist noch nicht verstanden. Es fehlen die für eine Sekretion normalerweise vorhandenen N-terminalen, hydrophoben Aminosäuren und die interne Signalsequenz. Zusammen mit dem acetylierten N-Terminus deutet dies eigentlich eher auf ein zytoplasmatisches Protein hin. Nachweislich im Zytoplasma gefunden hat man die A-Kette bisher u. a. in Thrombozyten und Monozyten sowie in Placenta, Uterus und Prostata. Wie die A-Untereinheit des pFXIII in das Blutplasma gelangt, ist deshalb noch umstritten.

Das aus zwölf Exons bestehende Gen der B-Kette liegt auf Chromosom 1q31–32.1 und ist 28 kb groß. Während Exon 1 und 12 für die beiden Termini codieren, stehen Exon 2 bis 11 für zehn sich wiederholende Sequenzen — Sushi-, Kringle- oder auch GP-I-Domänen⁶ genannt. Damit entstand die B-Untereinheit höchstwahrscheinlich durch Genduplikation. Von den 661 Aminosäureresten bilden 641 die reife B-Kette, welche eine Molmasse von 73 183 Da hat. Zusammen mit den gebundenen Zuckerresten erhöht sich die Molmasse auf rund 76,5 kDa. Die ersten 20 Aminosäuren bilden ein Signalpeptid, welches für die Sekretion der B-Ketten von Hepatozyten in das Plasma sorgt. Es gibt drei potentielle N-Glykosylierungstellen, an die auch nachweislich Zucker angefügt werden. In der Literatur wird für den Zuckergehalt der B-Untereinheit ein Wert von 8,5 % angegeben [12]. Zusätzlich werden bis zu 20 Disulfidbrücken postuliert, von denen allein 10 die typischen Disulfidbrücken in den sich wiederholenden Sequenzbereichen ausbilden. Ein Arg-Gly-Asp-Tripeptid wurde nahe am C-Terminus gefunden; solche RGD-Sequenzen kommen häufig in Proteinen vor, die in die Zelladhäsion involviert sind. Die 10 GP-I-Domänen können in vier Klassen eingeteilt werden, innerhalb derer die Sequenzidentität zwischen 34 und 42 % variiert. Es sind sehr viele Proteine mit solchen Domänen bekannt, und oft sind diese Proteine in der Regulation des Komplementsystems anzutreffen. Die GP-I-Domänen bestehen aus 60–70 Aminosäuren und enthalten vier konservierte Cysteinreste, die in ein charakteristisches Disulfidbrückenmuster eingebunden sind. Es ist stets das erste mit dem dritten, sowie das zweite mit dem vierten Cystein verknüpft. Weiterhin gibt es eine Reihe konservierter Proline, Tryptophane und Glycine.

1.3.2 Aktivierung und Reaktionsmechanismus

Die Aktivierungsmechanismen des pFXIII und des cFXIII sind besonders in den letzten Schritten sehr ähnlich, aber nicht identisch. Die Aktivierung des pFXIII ist wesentlich komplexer aufgrund des Vorhandenseins der B-Untereinheit. Der pFXIII wird zunächst durch Thrombin aktiviert. Dieses Enzym spaltet die Peptidbindung zwischen Arg37 und Gly38 in der A-Kette und ermöglicht das Entfernen des 37 Aminosäuren umfassenden Aktivierungspeptids (AP). Interessanterweise behindert die gebundene B-Untereinheit diese Reaktion in keiner Weise. Außerdem scheint die Abtrennung nur eines der beiden vorhandenen Aktivierungspeptide von pFXIIIa ausreichend für die Aktivierung zu sein [30]. Im Beisein von Calciumionen lösen sich nach dem Verdau durch Thrombin die B-Untereinheiten von den A-Untereinheiten und es entsteht so die noch inaktive Form pFXIII', die durch eine Calcium-abhängige Konformationsänderung in die aktive Form pFXIIIa umgewandelt wird [31].

Anders als der pFXIII ist der intrazellulär vorliegende cFXIII für Thrombin nicht erreichbar, so dass in diesem Fall das Enzym Calpain die Funktion des Thrombin

⁶Nach β_2 -Glycoprotein I benannt, welches eine ähnliche Aminosäuresequenz aufweist. Näheres unter 4.4 auf Seite 4.4.

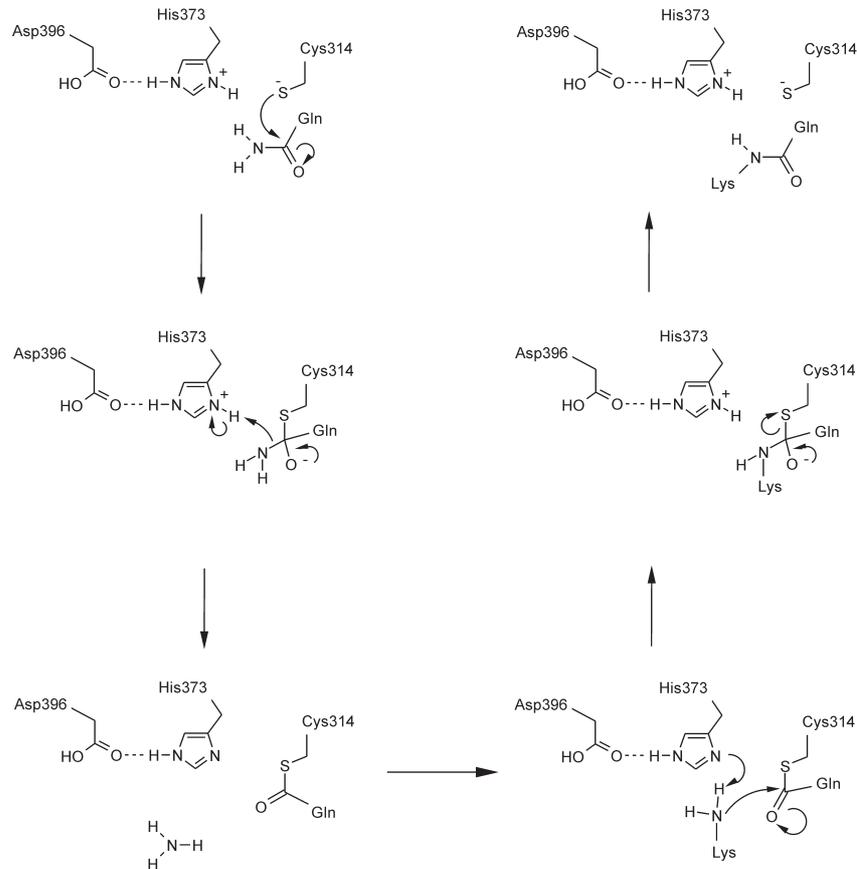
zu übernehmen scheint [32]. Bei hohen Thrombinkonzentrationen findet man eine zusätzliche Spaltstelle zwischen Lys513⁷ und Ser514, die jedoch unter physiologischen Bedingungen nicht relevant ist, da Calciumionen eine Spaltung an dieser Stelle unterbinden. Aufgrund von Untersuchungen der pFXIII-Enzymkinetik kam man zu der Erkenntnis, dass möglicherweise nur ein aktives Zentrum des aktiven Dimers für Reaktionen zur Verfügung steht. Der Grund für die „halbierte“ Aktivität ist noch unklar. Sicher ist jedoch, dass mindestens zwei Calciumionen pro Dimer binden und die Konformationsänderungen auslösen.

Fibrinogen, ein aus drei Polypeptidketten bestehendes und über Disulfidbrücken verbundenes Dimer $(\alpha\beta\gamma)_2$, spielt eine wichtige Rolle in der Aktivierung von pFXIII. Es reduziert die für die Dissoziation der B-Untereinheiten notwendige Konzentration an Calciumionen. Fehlt Fibrinogen, lösen sich die B-Untereinheiten von dem durch Thrombin gespaltenen pFXIII nur bei einer Calciumkonzentration, die um ein 10-faches über der im Plasma vorhandenen Konzentration liegt. Zusätzlich erleichtert Fibrinogen die Aktivierung von pFXIII durch Thrombin sehr stark [33]. Allerdings haben weder Fibrin-Monomere, noch fertig auspolymerisiertes Fibrin eine stimulierende Wirkung [34, 35]. Dieser Effekt wird u. a. durch die Bindung von pFXIII und Thrombin durch Fibrinpolymere und der damit verbundenen Zusammenführung der Reaktionspartner erreicht. Diese Wechselwirkung stellt sicher, dass pFXIIIa erst nach dem Erreichen einer kritischen Menge an Fibrinpolymeren gebildet wird. Anzumerken ist noch, dass pFXIII nach erfolgter Abspaltung des Aktivierungspeptids Fibrinogen schwächer bindet als der ungespaltene pFXIII [36]. Nahezu alle der im Blut zirkulierenden pFXIII-Moleküle liegen im Komplex mit Fibrinogen-Molekülen vor [12]. Dies resultiert weniger aus einer starken Affinität als aus der Tatsache, dass die Fibrinogenkonzentration im Blut etwa 20–100-fach über der des pFXIII liegt. Dieser Komplex besteht aus je einem pFXIII und zwei Fibrinogenmolekülen. Nach Moaddel *et al.* [37] wird dabei ein Komplex mit einer besonderen Fibrinogenvariante bevorzugt. Dieses Fibrinogen besitzt statt der üblichen γ - eine γ' -Kette, die sich von der normalen Form im C-Terminus unterscheidet. Die letzten vier C-terminalen Aminosäuren sind bei dieser Variante gegen ein 20 Reste umfassendes Peptid der Sequenz VRPEHPAETEDSLYPEDDL ausgetauscht. Diese Variation ist bei 7-15 % der im Plasma vorhandenen Fibrinogenmoleküle zu finden [38]. In Untersuchungen mittels Ultrazentrifugation konnte gezeigt werden, dass γ/γ' -Fibrinogendimere unter physiologischen Calciumkonzentrationen wesentlich stärker an pFXIII binden als γ/γ -Fibrinogendimere. Bedingt durch den Überschuss an γ/γ sind Komplexe zwischen dieser Form und pFXIII trotz schwächerer Bindung häufiger anzutreffen. Sobald Fibrinpolymere durch pFXIIIa quervernetzt sind, verlieren sie ihre stimulierende Eigenschaft auf die Spaltung von pFXIII durch Thrombin. Dieses Zusammenspiel von Thrombin, Fibrin(ogen) und pFXIII garantiert die örtliche und zeitliche Begrenzung der Bildung von aktivem pFXIIIa im Blutplasma.

In vitro konnte cFXIII auch ohne Thrombin aktiviert werden. Hierfür ist eine unphysiologisch hohe Konzentration an Calciumionen notwendig ($c > 50$ mM) [33]. Noch interessanter ist die Beobachtung, dass sich Faktor XIII mit 2 mM Calcium und 1 M Kochsalz aktivieren lässt, ja dass sogar ganz ohne Calcium in 1 M Kochsalz eine signifikante Aktivität gemessen werden konnte [39]. Dies wirft natürlich die Frage auf, ob das Aktivierungspeptid durch die hohe Ionenstärke von seinem natürlichen Bindungsplatz abgelöst wird oder warum gegebenenfalls die Abspaltung in diesem Fall nicht notwendig ist.

Um eine ausreichende Menge an Substraten kovalent mit Fibrin verknüpfen zu können, haben pFXIII und pFXIIIa mehrere spezifische Bindungsorte auf dem Fibrin. Dabei binden die Zymogene von pFXIII und cFXIII nicht an dieselben Stellen wie die aktivierte Form pFXIIIa. Am besten ist die Bindung an die A α -Kette

⁷Zur Vereinfachung wird in dieser Arbeit der Dreibuchstabencode für Aminosäuren verwendet.

Abbildung 1.2: Reaktionsmechanismus nach Pedersen *et al.* [40].

von Fibrinogen charakterisiert. Diese Stelle zwischen den Resten 243 und 476 unterstützt die Calcium-abhängige Dissoziation der B-Untereinheiten von dem durch Thrombin prozessierten Heterotetramer. Sowohl das Aktivierungspeptid als auch die B-Untereinheit werden nicht von der vernetzten Fibrin-Matrix gebunden.

Faktor XIII vernetzt nicht nur Fibrin untereinander, sondern auch andere Plasmaproteine mit Fibrin. Einige Beispiele hierfür sind α_2 -Plasmininhibitor, Fibronektin, von-Willebrand-Faktor, Thrombospondin, Vitronektin und Lipoprotein A. Diese Proteine spielen eine bedeutende Rolle in Fibrinolyse, Wundheilung und Zelladhäsion und verdeutlichen die Bedeutung des pFXIII über den Wundverschluss hinaus.

Der postulierte Reaktionsmechanismus ähnelt dem von Cysteinproteasen, wobei Faktor XIII natürlich die umgekehrte Reaktion, nämlich die Knüpfung einer (Iso)Peptidbindung, katalysiert [40]. Diese Annahme ist schon allein dadurch gerechtfertigt, dass die aktiven Zentren diverser Cysteinproteasen (z. B. Papain) sich sehr gut mit dem von Faktor XIII überlagern lassen. Die Geometrie der katalytischen Triade von Papain und FXIII ist nahezu identisch, wobei in FXIII die Funktion des Asparagins durch eine Asparaginsäure übernommen wird. So enthält der in Abb. 1.2 dargestellte Reaktionsablauf viele von Proteolysemechanismen bekannte Elemente wie z. B. den nucleophilen Angriff des aktivierten Cysteinrests, tetraedrische Übergangszustände und ein Acylenzym. Allerdings wird das Acylenzym nicht

einfach hydrolysiert, sondern überträgt die gebundene Glutaminseitenkette auf eine Lysinseitenkette. Dieser Schritt erfordert zwingend das Fernhalten von Wasser und die Bereitstellung einer richtig ausgerichteten Lysinseitenkette. Damit ist die Transglutaminasereaktion wesentlich komplexer, als die von Proteasen katalysierte Hydrolyse einer Peptidbindung. Leider existiert noch keine Struktur einer Transglutaminase mit einem gebundenen Substrat, mit der sich dieser Reaktionsmechanismus überprüfen lassen könnte.

1.3.3 Arbeiten zur Kristallisation von Faktor XIII

Im Jahre 1990 publizierten zwei Gruppen unabhängig voneinander Kristallisationsbedingungen für den zellulären Faktor XIII bestehend aus den zwei A-Ketten des im Blutplasma zu findenden Blutgerinnungsfaktor XIII. In der zuerst eingereichten, jedoch später erschienenen Arbeit von P.D. Bishop *et al.* [41] wird die Kristallisation von gentechnisch in *S. cerevisiae* hergestelltem Faktor XIII in der orthorhombischen Raumgruppe $P2_12_12$ beschrieben. Die Kristalle wuchsen bei einer Fällungsmittelkonzentration von 0,8 M Ammoniumsuccinat, Ammoniumsulfat oder Ammoniumphosphat, einem pH-Wert von 5,8 und einer Temperatur von 20 °C innerhalb von 2 Wochen auf eine Größe von bis zu 400 μm Kantenlänge heran. Allerdings erlaubten diese Kristalle nur einen Datensatz bis 3,5 Å Auflösung zu sammeln, wobei einzelne Reflexe bis 2,8 Å sichtbar gewesen sein sollen. Diese Kristallisationsbedingungen führte schließlich zu der 1994 publizierten Struktur von Faktor XIII durch V.C. Yee [42].

Die zweite Publikation stammt von R. Hilgenfeld *et al.* [43] und beschreibt die Kristallisation von FXIII bei Raumtemperatur (20 °C) in zwei verschiedenen Raumgruppen. Die darin als Kristallform I bezeichneten monoklinen Kristalle wurden bei der Verwendung von 6,5 % (w/v) PEG4000 als Fällungsmittel und einem pH-Wert von 7,2 gefunden. Von diesen Kristallen konnte ein Datensatz mit einer Auflösung von 2,7 Å gesammelt werden. Die orthorhombische Kristallform (Kristallform II), welche bei 10,5 % (w/v) Ammoniumacetat und einem pH-Wert von 7,4 gefunden wurde, entsprach der von Bishop *et al.* beschriebenen Kristallform, auch wenn die Raumgruppe in diesem Fall mit $P2_12_12_1$ angegeben wurde. Spätere Ergebnisse zeigten, dass die richtige Raumgruppe $P2_12_12$ ist. Das Auflösungslimit des von dieser Kristallform gesammelten Datensatzes lag bei 3,0 Å. Der Tatsache geschuldet, dass die monoklinen Kristalle die Röntgenstrahlen zu höherer Auflösung streuten, wurden alle hochaufgelösten Strukturen von monoklinen Kristallen gewonnen [44, 45]. Die für das Wachsen von monoklinen Faktor XIII-Kristallen notwendigen Bedingungen wurden später optimiert und in leicht abgeänderter Form in [45] und [46] beschrieben.

1.3.4 Struktur

Die dreidimensionale Struktur des cFXIII wurde durch Röntgenstrukturanalyse bestimmt. Ein erstes Strukturmodell wurde 1994 bei mittlerer Auflösung (2,8 Å, siehe [42]) publiziert⁸ und zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit war die 1998 in die Datenbank gestellte 2,1 Å-Struktur die beste verfügbare Struktur von Faktor XIII [45], die jedoch inzwischen von einer 2,0 Å-Struktur der W279F-Mutante übertroffen wurde.

Die annähernd globuläre Struktur des Dimers ist in Abb. 1.3 dargestellt⁹. Jedes

⁸Zwar wird in der Publikation eine Auflösung von 2,8 Å angegeben, die in der Strukturdatenbank (PDB-Code 1GGT) hinterlegte Struktur weist jedoch eine Auflösung von 2,65 Å auf.

⁹Da in den oben aufgeführten Strukturen Teile der Struktur nicht, bzw. nur schlecht definiert sind, wurden zur besseren Darstellung die Daten der in Abschnitt 4.1.2 vorgestellten Struktur verwendet.

PDB-Code	Jahr	Auflösung	R/R _{free}	Beschreibung
1GGT	1994	2,65 Å	0,216/- ^a	erste FXIII-Struktur [42]
1FIE	1996	2,50 Å	0,182/- ^b	Struktur nach Thrombin-Verdau [47]
1F13	1998	2,10 Å	0,183/0,236	zwei neue cis-Peptidbindungen [45]
1GGY	1998	2,50 Å	0,188/0,281	Komplex mit Ytterbium [48]
1GGU	1998	2,10 Å	0,227/0,313	Komplex mit Calcium [48]
1QRK	1999	2,50 Å	0,183/0,275	Komplex mit Strontium [48]
1EVU	2000	2,01 Å	0,208/0,266	Komplex mit Calcium [48]
1EX0	2000	2,00 Å	0,187/0,234	W279F-Mutante [48]

Tabelle 1.2: Auflistung aller in der PDB-Datenbank enthaltener FXIII-Strukturen in chronologischer Reihenfolge.

^anicht angegeben

^bnicht angegeben

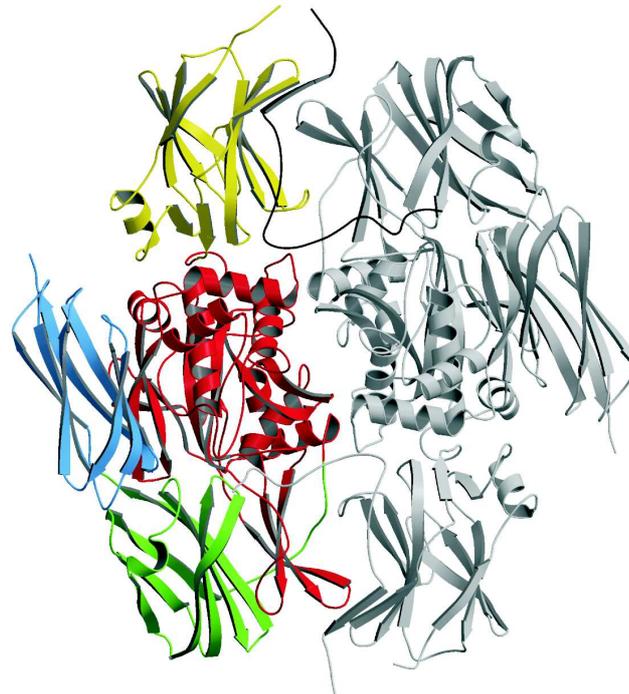


Abbildung 1.3: cFXIII-Dimer (PDB-Code 1F13), wobei bei einem Monomer das Aktivierungspeptid schwarz, Domäne 1 gelb, Domäne 2 rot, Domäne 3 grün und Domäne 4 blau dargestellt sind.

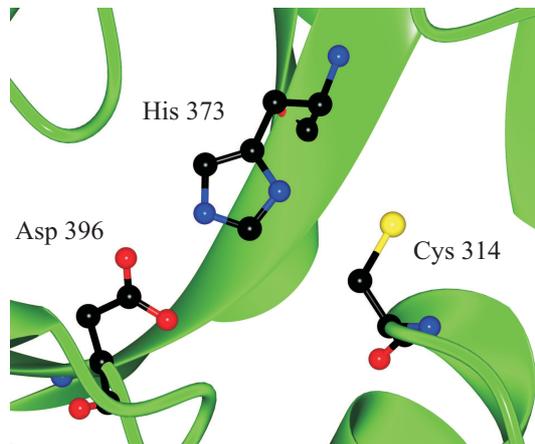


Abbildung 1.4: Ansicht der katalytischen Triade von FXIII.

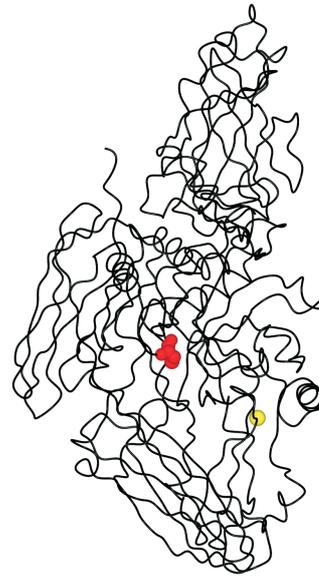


Abbildung 1.5: Position des aktiven Zentrums (rot) relativ zum gebundenen Calcium.

Monomer besteht aus dem Aktivierungspeptid und vier Domänen. Am N-Terminus beginnend, umfasst das Aktivierungspeptid die Aminosäuren 1–37. Daran schließen sich die Domänen 1 (38–185) und 2 (197–503) an, bevor die beiden dem Fibronectin Typ III ähnlichen Domänen 3 (517–628) und 4 (632–731) die Architektur des Moleküls komplettieren.

Die 37 Aminosäurereste des Aktivierungspeptids eines jeden Monomers liegen im Dimer wie eine Art Anker auf dem jeweiligen Nachbarmolekül. Sie werden durch Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen fixiert und scheinen zumindest teilweise auch nach erfolgter Abspaltung am Dimer zu verbleiben [47]. Die von Thrombin gespaltene Peptidbindung 37–38 befindet sich in einer flexiblen Schlaufe und ist deshalb in der Struktur nicht gut definiert. Die auf das Aktivierungspeptid folgende Domäne 1 besteht nahezu ausschließlich aus β -Strängen, wobei zwei viersträngige β -Blätter ein offenes Fass bilden.

Eine in vielerlei Hinsicht herausragende Rolle spielt die Domäne 2. Sie ist mit über 300 Aminosäuren mit Abstand die größte Domäne, trägt die katalytische Triade und beinhaltet als einzige Domäne in diesem Protein neben β -Strängen auch α -Helices. Im Zentrum befindet sich ein sechs-strängiges β -Faltblatt, um welches sich insgesamt neun α -Helices gruppieren. Am N-Terminus einer aus 15 Resten bestehenden α -Helix¹⁰ befindet sich das aktive Cystein. Es wird in der Zymogenstruktur u. a. von Tyr560 (aus Domäne 3) abgeschirmt, von dessen OH-Gruppe es eine Wasserstoffbrücke akzeptiert, und hat keinen Kontakt zum umgebenden Medium. Es wurde darüber berichtet, dass bei Entfernung dieses Tyrosins das Cystein im aktiven Zentrum eine Disulfidbrücke zum in der Nähe befindlichen Cystein 374 eingeht [9]. Möglicherweise spielt Tyr560 eine noch unbekannt, aber nicht unbedeutende Rolle in der Aktivierung oder aber der enzymatischen Reaktion. Das Cystein im aktiven Zentrum ist von einer für verschiedene Transglutaminasen typischen Aminosäuresequenz (Tyr-Gly-Gln-Cys-Trp) umgeben, welche in ähnlicher Weise auch in Cystein-

¹⁰siehe dazu auch die Diskussion der Sekundärstruktur auf Seite 74

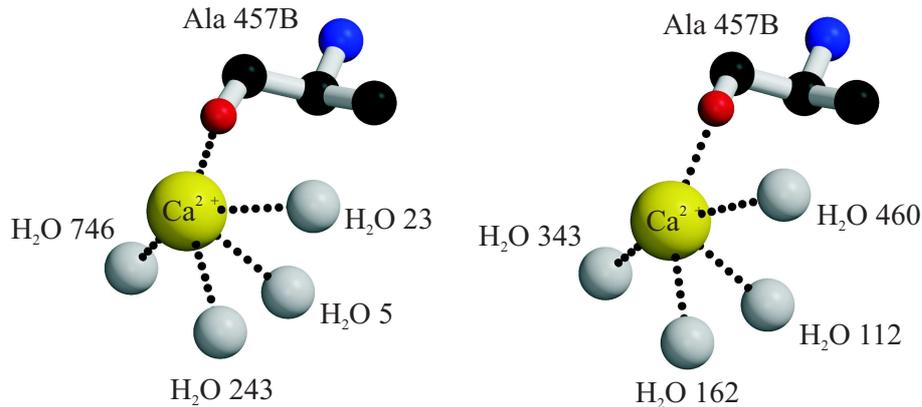


Abbildung 1.6: Die in den Strukturen 1GGU (links) und 1EVU (rechts) definierte Calciumbindung. Es ist jeweils nur die Calciumbindung in der B-Untereinheit abgebildet, da der Temperaturfaktor des Calciumions in der B-Untereinheit deutlich unter dem in der A-Untereinheit liegt und damit besser definiert sind.

Proteasen anzutreffen ist. Die weiteren Mitglieder der katalytischen Triade, His373 und Asp396, befinden sich auf dem gegenüberliegenden, zentralen β -Faltblatt. Die in der Abbildung 1.4 dargestellte räumliche Anordnung der drei Aminosäuren ist der in Papain sehr ähnlich, wie bereits von Pedersen *et al.* [40] beschrieben wurde.

In der Nähe des aktiven Cys314 befindet sich zwischen Arg310 und Tyr311 eine *cis*-Peptidbindung [45]. Diese energetisch ungünstige Konformation ist in Proteinen in der Regel nur bei dem Iminosäurerest Prolin anzutreffen.¹¹ cFXIII weist als Besonderheit gleich zwei *cis*-Peptidbindungen auf, an denen Prolin nicht beteiligt ist: die erwähnte Arg310-Tyr311-Bindung am aktiven Zentrum und die Bindung zwischen Gln425 und Phe426 in der Kontaktfläche der beiden Monomere. Es ist die Hypothese aufgestellt worden, dass die in diesen *cis*-Peptidbindungen „gespeicherte“ Energie genutzt wird, um die mit der FXIII-Aktivierung verbundene Konformationsänderung zu initiieren [45]. Bisher sind aber weder die Struktur der aktiven Form noch die sich bei der Aktivierung vollziehenden Strukturänderungen bekannt.

Im Gegensatz dazu ist die Bindungsstelle von Calcium bereits bekannt [48, 49]. Auch sie befindet sich wie in Abbildung 1.5 gezeigt ist an Domäne 2, die häufig auch als Kerndomäne bezeichnet wird. Eine direkte Interaktion mit dem aktiven Zentrum ist unmöglich, da sich das Calciumion des selben Monomers 20 Å und das des Nachbarmonomers gar 48 Å entfernt ist. Untypischerweise besitzt das gebundene Calciumion nur einen direkten Proteinliganden — den Hauptkettensauerstoff von Alanin 457. Die restlichen Liganden sind Wassermoleküle, wie in Abbildung 1.6 zu sehen ist. Die in der Literatur oft genannten sauren Aminosäuren Asp438, Glu485 und Glu490 unterstützen zwar möglicherweise mit ihren in der Nähe befindlichen negativen Ladungen die Calciumbindung, sind jedoch für eine direkte Bindung eindeutig zu weit entfernt.

Eine weitere Besonderheit der Kerndomäne ist ein kleines, 3-strängiges β -Faltblatt, welches wie ein Finger aus der ansonsten kompakten Struktur herausragt und eine große Kontaktfläche zur Domäne 3 ausbildet. Diese Domäne und die strukturell sehr ähnliche Domäne 4 sind Fibronectin Typ III ähnlichen Domänen. Dies ist an dem 7-strängigen β -Fass und der so genannten „3+4“-Anordnung der einzelnen β -Stränge ersichtlich.

Im Gegensatz zur A-Untereinheit ist über die Struktur der B-Untereinheit we-

¹¹Anhand der bisher bestimmten Strukturen weiss man, dass ca. 5% aller Proline in der *cis*-Konformation vorliegen.

nig bekannt. Aus elektronenmikroskopischen Arbeiten geht hervor, dass die B-Ketten lange, flexible Strukturen ausbilden, welche sich um die A-Untereinheit legen [50]. Bisher aufgeklärte Strukturen von verwandten Proteinen, welche wie die B-Untereinheit aus GP-I-Domänen aufgebaut sind, bestätigen diesen Befund. Ein zuverlässiges Model für das Heterotetramer lässt sich jedoch schon allein wegen der fehlenden Informationen über die Interaktion zwischen A- und B-Untereinheiten nicht aufstellen.

1.4 Ziel dieser Arbeit

Sowohl der genaue Mechanismus der Faktor XIII-Aktivierung als auch die Struktur der aktiven Konformation sind nahezu unbekannt. Man kann lediglich aus der Tatsache, dass das Cystein im aktiven Zentrum im Inneren des Proteins für Substrate unzugänglich ist, schlussfolgern, dass es eine Konformationsänderung geben muss. Das Ziel dieser Arbeit war deshalb das bessere Verstehen des Aktivierungsprozesses und der aktiven Konformation von Faktor XIII. Ein Vergleich verschiedener FXIII-Strukturen sollte daher Auskunft über den Aktivierungsmechanismus geben. Im diesem Zusammenhang wurde die Aufklärung einer FXIII-Struktur in der aktiven Konformation mit gebundenem Substrat angestrebt. Parallel dazu sollte mit einer genaueren FXIII-Struktur der Frage nachgegangen werden, ob es zusätzlich zu der bekannten nicht noch weitere Calciumbindungsstellen gibt und wenn möglich deren Funktion geklärt werden.

Es war von Anfang an klar, dass wohl nicht alle Ziele erreicht würden. Allerdings wäre auch ein Teilerfolg ein großer Schritt für das Verständnis dieses besonderen Enzyms.

Kapitel 2

Materialien

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte/Materialien	Typ	Hersteller
SDS-Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN II	BIO-RAD
Thermomixer	diverse	Eppendorf
pH-Meter	CG840	Schott
Waage	MC5	Sartorius
Stereomikroskop	SZH10	Olympus
Kristallisationsplatten	VDX und Costar	Greiner
silikonisierte Deckgläschen		Hampton Research
mounted CryoLoops		Hampton Research
HPLC-Einheit		Shimazu
Massenspektrometer		Kratos
Röntgenstrahlgenerator	FR 591	Nonius
100 K-Kühlsystem		Oxford Cryosystems
10 ml Einmalspritzen		Braun
0,8 μ m Sterilfilter	MILLEX-AA	Millipore
30 kDa Filter	Microcon YM-30	Amicon

2.2 Chemikalien und Enzyme

Sepharose-Thrombin, 1430 U/ml	von J. Stürzebecher, FSU Jena, erhalten
humanes Thrombin, 3023 U/mg	Kordia
Cerulein	Calbiochem
Tridegin	von J. Stöckel, Curacyte, erhalten
PPACK als Trifluoroacetat-Salz	Bachem
Fmoc-Amid-Harz (D-1675)	Bachem
DMF	Fluka
DMC	Fluka
Faktor XIII, 8,6 mg/ml	von H. Metzner, Aventis Bering GmbH, erhalten
Plasma-Faktor XIII, 5,8 mg/ml	von H. Metzner, Aventis Bering GmbH, erhalten
p-Nitroanilid-Substrat	von T. Steinmetzer, Curacyte, erhalten
Substratpeptid	von P. Wadhvani, FSU Jena, erhalten
Triplex III (EDTA)	Merck
Triplex VI (EGTA)	Merck

2.3 Puffer und Stammlösungen

Aktivierungspuffer	50 mM TRIS pH 7,4 154 mM NaCl
Calciumchloridlösung	300 mM CaCl ₂ in dH ₂ O
Natriumchloridlösung	1 M NaCl in dH ₂ O
CHAPS-Stammlösung	100 mM in dH ₂ O
PPACK-Stammlösung	0,66 mg/ml in dH ₂ O
Cerulein-Stammlösung	1,3 mg/ml in Aktivierungspuffer 5 % DMSO
Thrombin-Stammlösung	0,143 U/ μ l in Aktivierungspuffer
Substratpeptid-Stammlösung (Sequenz: TIGEGQQHHLGGAKQAGDV)	20 mg/ml

2.4 Kits und Assays

Grid Screen Ammonium Sulfate	Hampton Research Corp.
Grid Screen 2-Methyl-2,4-pentandiol	Hampton Research Corp.
Grid Screen Polyethylene 6000	Hampton Research Corp.
Grid Screen PEG/LiCl	Hampton Research Corp.
Quik Screen	Hampton Research Corp.
Crystal Screen 1	Hampton Research Corp.
Crystal Screen 2	Hampton Research Corp.
JBScreen 1–10	JenaBioscience
Berichrom Assay	Dade Bering
Bradford Protein Assay	Biorad

Kapitel 3

Methoden

3.1 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese beruht auf dem Prinzip der Trennung verschiedener Proteine im elektrischen Feld aufgrund unterschiedlicher Ladungen und Größe [51]. Hierzu wurden die Proben stets kurz zentrifugiert, der Überstand 1:1 mit SDS-Probenpuffer (reduzierend mit Harnstoff) gemischt und anschließend durch Erhitzen vor dem Gelauftrag denaturiert. Es kamen 7,5%ige Gele des Typs Mini-PROTEAN II der Firma BIO-RAD und 10%ige Gele des Typs NuPage der Firma Invitrogen zum Einsatz. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine mit der Coomassie-Blue-Färbung sichtbar gemacht.

3.2 Expression in *E. coli*

Für Kristallisationsversuche mit verschiedenen FXIII-Varianten war es nötig, dieses Material in *E. coli* zu exprimieren und anschließend aufzureinigen. Diese Arbeitsschritte wurden fast ausschließlich mit inaktiven Varianten, wie z. B. der H373A-Mutante¹, durchgeführt. Alle *E. coli*-Mutanten wurden freundlicherweise von Prof. Charles Greenberg, Duke University, Durham (NC) zur Verfügung gestellt. In der Literatur wird zwar oft die Nutzung von *S. cerevisiae* beschrieben, diese Klone waren aber leider nicht verfügbar.

Eine Übernachtskultur in LB-Medium wurde nach ca. 17 Stunden bei 37 °C zum Animpfen eines 10l Fermertors verwendet. Die Zellen anschließend per Zentrifugation geerntet und in einem 20 mM Bis-TRIS-Puffer im Beisein von 50 mM NaCl, DTT, Aprotinin und PMFS gelöst. Anschließend erfolgte die Öffnung der Zellen mittels Ultraschall oder French Press.

3.3 Aufreinigung von Faktor XIII

Nach der Abtrennung der Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 22'000g wurde Streptomycinsulfat zur Ausfällung der Nukleinsäuren zugesetzt und anschließend wieder zentrifugiert, bis sich eine klare Lösung ergab. Nach einer Dialyse gegen den erwähnten Bis-TRIS-Puffer erfolgte der Auftrag auf eine Q-Sepharose-Säule. Zur Elution des Proteins von der Säule wurde ein NaCl-Gradient von 50 mM bis 200 mM verwendet. Nach Bestimmung der FXIII-enthaltenden Fraktionen mittels Western Blot wurde eine Amoniumsulfat-Fällung durchgeführt. Das Pellet wurde

¹Die Bezeichnungen von Mutanten werden üblicherweise im Einbuchstabencode angegeben. Somit steht H373A für den Austausch von Histidin 373 durch Alanin.

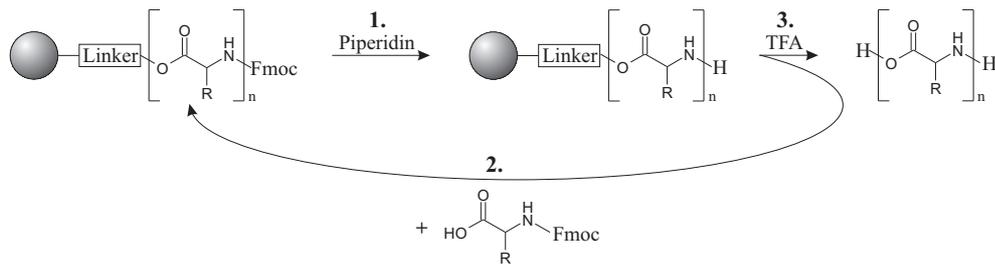


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der einzelnen Syntheseschritte: 1. Aktivierung des harzgebundenen Peptids, 2. Kopplung einer weiteren Aminosäure und 3. Abspaltung des fertigen Peptids und Entfernung aller Schutzgruppen nach Abschluss der Synthese.

gegen 25 mM Bis-TRIS, pH 6,7, 1 mM DTT, 1 mM EDTA und 4% Taurin dialysiert und auf eine Mono P-Säule aufgetragen². Auch hier erfolgte die Identifikation der interessanten Fraktionen mittels Western Blot.

3.4 Western Blot

Die zu analysierenden Proben wurden zusammen mit einer FXIII-Standard-Probe auf einem 7,5 %igen SDS-Gel aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran überführt. Dies erfolgte mit einer Semi-Dry-Apparatur der Firma Biorad. Die Membran wurde anschließend mit einer 5 %igen Trockenmilch-Lösung auf die Antikörperbehandlung vorbereitet. Zur Markierung des Faktor XIII diente ein Anti-FXIII-Antikörper vom Esel. Nach intensivem Waschen wurde mit einem Ziegen-Antikörper gegen den Esel-Antikörper der letztere markiert, wobei der Ziegen-Antikörper mit einer Peroxidase gekoppelt war. Diese bewirkte über Chemolumineszenz eine Färbung des Films an den entsprechenden Stellen. Somit konnten die FXIII-Banden im SDS-Gel und gleichzeitig die FXIII-haltigen Fraktionen identifiziert werden.

3.5 Festphasensynthese von Peptiden nach Merrifield

Die 1963 von Merrifield vorgestellte Synthese von Peptiden an einem unlöslichen Harz vereinfachte und beschleunigte die bis dahin aufwendige Peptidsynthese [52]. Dabei werden bei jedem Anfügen einer weiteren Aminosäure an ein Peptid, welches über einen Linker mit dem Harz verbunden ist, die in Abbildung 3.1 dargestellten Schritte absolviert. Anzumerken ist, dass alle reaktiven Gruppen der verwendeten Aminosäuren durch Schutzgruppen blockiert sind, was unerwünschte Nebenreaktionen verhindern soll.

Da es nie zu einem 100 %igen Umsatz kommt, entstehen immer unerwünschte Nebenprodukte, die um so zahlreicher sind, je mehr Zyklen die Synthese umfasst. Aus diesem Grund ist eine Reinigung nach Abschluss der Peptidsynthese zwingend notwendig.

Als Festphase wurde stets ein Fmoc-Amid-Harz der Firma Bachem verwendet.

²Eine von Dr. Stöckel, Curacyte, an Faktor XIII angehängte Histidin-Kette, welche die Aufreinigung erheblich vereinfachte, erhöhte die Ausbeute auf etwa 20 μg pro l *E. coli*-Kultur. Allerdings gab es auch in diesem Fall große Probleme mit der Aufkonzentration und Stabilität.

Davon wurden zunächst 150 mg in eine Einweg-Plastikspritze³ eingewogen und das Harz anschließend in DMF für 10 min unter Schütteln quellen lassen. Die DMF-Lösung wurde danach verworfen. Darauf folgte unter ständigem Schütteln eine Fmoc-Abspaltung mit einer 20 %igen Piperidinlösung in DMF in zwei Schritten von 5 min bzw. 10 min Dauer. Die beiden daraus resultierenden Piperidinlösungen wurden vereinigt, das Volumen bestimmt und mittels Extinktionsmessung bei 301 nm die Fmoc-Stoffmenge⁴ berechnet. Dieser Schritt wurde nach jeder Kopplung einer Fmoc-Aminosäure wiederholt, um die Ausbeute bestimmen zu können. Nach intensivem Waschen mit verschiedenen DMF-Lösungen die das vollständige Entfernen von Piperidinresten sicherstellen sollten, wurde zwei Stunden lang unter Schütteln eine Fmoc-Aminosäure gekoppelt. Diese wurde im reichlich 1,3fachen Überschuss zusammen mit dem Kopplungsreagenz HBTU und DIEA zu dem Harz gegeben. HBTU vermittelt bei der Kopplung in der Weise, dass es das harzgebundene Peptid aktiviert und somit zur Verbesserung der Ausbeute beiträgt. DIEA ist für die Neutralisierung der Aminosäure und den Erhalt der basischen Reaktionsbedingungen im Verlauf der Reaktion wichtig. Zur Kontrolle, ob die Menge an DIEA ausreichend war, wurde nach jeder Kopplung der pH-Wert überprüft. Nach abschließendem Waschen und Fmoc-Bestimmung konnte eine weitere Aminosäure gekoppelt werden. Nach der letzten Fmoc-Bestimmung und den anschließenden Waschschritten wurde mit DMC gewaschen und das Produkt lyophilisiert. Die Abspaltung des fertigen Peptids vom Harz erfolgte mit 90 % TFA in Wasser. Hierfür wurde 90 min bei Raumtemperatur geschüttelt und die Lösung anschließend direkt in ca. 40 ml Diethylether gespritzt. Diese Lösung ruhte dann zur vollständigen Fällung des Peptids für ca. 90 min auf Trockeneis. Bei etwa 4000 g konnte danach das Peptid als Pellet geerntet werden und an der Luft bei Raumtemperatur trocknen. Die Reinigung erfolgte anschließend per HPLC.

3.6 Reinigung der synthetisierten Peptide mittels HPLC

Wie bereits beschrieben, ist nach einer Festphasen-Peptidsynthese eine Reinigung zwingend notwendig. Zunächst wurden aus dem Syntheseprodukt mit einer analytischen HPLC⁵ die Hauptbestandteile extrahiert. Dafür wurden einige Mikrogramm des Peptids in ca. 2 ml einer 50 %igen Acetonitril-Wasser-Lösung aufgenommen und auf eine HPLC-Säule aufgetragen. Dabei kam eine so genannte Reversed Phase Säule zum Einsatz, bei der das hydrophile Säulenmaterial mit langkettigen Kohlenwasserstoffen hydrophobisiert ist. Mit einem ansteigenden Acetonitrilgradienten wurde anschließend von der Säule eluiert und mit einem UV-Detektor der HPLC-Lauf dokumentiert. Die Peaks wurden manuell aufgefangen und anschließend mit einem Massenspektrometer überprüft. Das größte Signal in der HPLC stammte stets vom gewünschten Produkt. Nach Identifizierung der richtigen Fraktion konnte die gesamte Peptidmenge mittels präparativer HPLC gereinigt werden.

3.7 Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine Methode zur exakten Massenbestimmung von Molekülen. Dabei werden die zu untersuchenden Moleküle zunächst ionisiert, durch

³Aufgrund der einfachen Handhabung wurde sich für den Einsatz von Plastikspritzen mit Fritte entschieden. Diese konnten mit einer speziellen Halterung auf einem Schüttler montiert werden.

⁴Dafür wurde für Fmoc ein Wert von $\epsilon_{301\text{ nm}} = 7200\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet.

⁵Man unterscheidet analytische HPLC, bei der es auf die feine Auftrennung der in der Probe enthaltenen Komponenten ankommt, und der präparativen HPLC, die hinsichtlich der Trennung großer Stoffmengen optimiert ist.

elektrische oder magnetische Felder getrennt und anschließend mit einem Detektor, in der Regel ein Sekundärelektronenvervielfacher, die Signale gemessen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden zwei verschiedene Methoden der Ionisation angewandt. Bei der unter der Abkürzung MALDI bekannten Methode der Ionisation durch Laserimpuls, wird das Untersuchungsmaterial mit einer sog. Matrix⁶ gemischt, auf ein Gitter aufgetragen und getrocknet. Mit kurzen, intensiven Laserimpulsen wird anschließend das Untersuchungsmaterial mit der verdampfenden Matrix in die Gasphase überführt und ionisiert.

Bei einigen Untersuchungen wurde statt MALDI eine Elektro-Spray-Ionisation (ESI) verwendet. Über eine Stahlkapillare, an der ein elektrisches Feld anliegt, werden die gelösten Moleküle in eine Ionisationskammer gesprüht und ionisiert. Dabei bildet sich ein Tröpfchennebel und durch das Verdampfen des Lösungsmittels entstehen desolvatisierte Molekülionen. Diese Methode ist schonender als MALDI, da es nicht kurzzeitig zu einem extremen Temperaturgradienten kommt. Allerdings sind die mit ESI ionisierten Moleküle oft mehrfach geladen, was die Messung an sich erleichtert, die Auswertung jedoch erschwert.

In modernen Geräten wird die Masse der untersuchten Moleküle häufig unter Verwendung der Flugzeit (time of flight, TOF) bestimmt, da bei gleicher Ladung die schweren Moleküle im elektrischen Feld langsamer beschleunigt werden und somit mehr Zeit bis zum Detektor benötigen. Anhand von parallel gemessenen Referenzwerten (z. B. BSA), kann schließlich die Masse berechnet werden.

3.8 Aktivitätsbestimmung von Thrombin

Zur Bestimmung der Thrombin-Aktivität wurde ein p-Nitroanilid-Substrat verwendet. Dabei ist p-Nitroanilid C-terminal an das Arginin gekoppelt, hinter welchem Thrombin spaltet. Die Freisetzung des p-Nitroanilins ist spektralphotometrisch bei 405 nm messbar.

Die Bestimmung der geeigneten PPACK-Menge zur vollständigen Inhibition der zur FXIII-Aktivierung eingesetzten Menge an Thrombin erfolgte durch sukzessive Erhöhung des zugesetzten Volumens an PPACK-Lösung. In dem 1 ml umfassenden Ansatz waren dabei Puffer (50 mM TRIS-HCl pH 8,0, 0,1 M NaCl und 0,1 % PEG 6000), ein bestimmtes Volumen der PPACK-Lösung, 16 μ l Thrombin-Lösung und 10 μ l p-Nitroanilid-Substrat enthalten. Nach Zugabe aller Komponenten bis auf das Nachweissubstrat wurde gut gemischt und nach Zugabe des Substrats 5 min gewartet, bevor die Extinktion bestimmt wurde.

3.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bradford Protein Assay der Firma Biorad. Dabei wurden wenige μ l der zu testenden Probe in eine Küvette pipettiert, mit Wasser auf 800 μ l aufgefüllt und dazu 200 μ l der Nachweislösung gegeben. Nach 5 min erfolgte die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm, wobei als Nullwert eine Probe ohne Protein zum Einsatz kam. Die Proteinkonzentration wurde anschließend anhand einer mit unterschiedlichen FXIII-Konzentrationen erstellten Eichgeraden berechnet.

⁶Diese dient der besseren Absorption der Laserenergie. Es kamen hierbei Lösungen von α -Cyano-4-hydroxyzimtsäure und Sinapinsäure zum Einsatz.

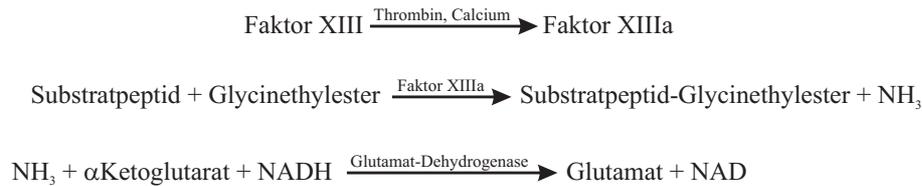


Abbildung 3.2: Reaktionen im Berichrom Assay.

3.10 Aufkonzentration von FXIIIa-Lösungen

Die Aufkonzentration erfolgte durch Ultrafiltration. Dabei wird die Proteinlösung durch Zentrifugation gegen eine Membran gedrückt, deren Porengröße kleiner als der Proteindurchmesser, aber ausreichend groß für das Lösungsmittel ist. Deshalb verringert sich das Volumen der Probe und gleichzeitig steigt die Proteinkonzentration. Es liegt in der Methode begründet, dass nahezu alle gelösten Stoffe etwas aufkonzentriert werden. Der Effekt macht sich um so stärker bemerkbar, je größer das entsprechende Molekül ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass eventuelles Präzipitieren nicht bemerkt wird, da der Niederschlag sofort auf die Membran sedimentiert und die erhaltene Proteinlösung somit immer klar ist.

Im Falle von FXIIIa kamen Filtereinheiten der Firma Amicon, Typ Microcon YM-30 zum Einsatz. Die Porengröße betrug 30 kDa⁷, was FXIIIa garantiert am Passieren der Membran hinderte. Die FXIIIa-Lösung wurde mit ca. 8000 g aufkonzentriert und das Volumen am Ende mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette abgeschätzt.

3.11 Aktivitätsbestimmung von Faktor XIII mit dem Berichrom Assay

Zur Bestimmung der Aktivität von Faktor XIII existiert bereits ein Testkit der Firma Dada Bering mit dem Namen Berichrom Assay. Dieser Assay beruht auf den Arbeiten von K. Fickenscher *et al.* [53] und basiert auf der Kopplung der Transglutaminaseaktivität an den Verbrauch von NADH, dessen Konzentration sich gut photometrisch bei 340 nm bestimmen lässt. In Abbildung 3.2 sind die zugrunde liegenden chemischen Reaktionen dargestellt. Nach der Zugabe vom Faktor XIII wird dieser zunächst durch Thrombin aktiviert, so dass es am Anfang zu einer langsamen Zunahme der Faktor XIII-Aktivität in der Lösung kommt. Dieser Effekt kann natürlich nicht bei Verwendung von FXIIIa beobachtet werden, was im Laufe dieser Arbeit häufig der Fall war. Daran anschließend sollte es zu einem linearen Abfall der gemessenen Extinktion kommen, bis das Substrat verbraucht ist. Die Extinktionsänderung pro Zeiteinheit ist dabei direkt proportional zur Faktor XIII-Aktivität in der Lösung.

Für die Bestimmung der Faktor XIII-Aktivität wurden in der Regel 200 μl Berichrom Assay mit 50 μl Aktivierungspuffer (50 mM MES pH 7,4 und 154 mM NaCl) und 25 μl Faktor XIII ($c = 0,086 \text{ mg/ml}$) gemischt und in einer Quarzküvette bei Raumtemperatur über einen Zeitraum von 15 min vermessen. Bei der Auswertung wurde ein möglichst großer Bereich, der eine annähernd lineare Abnahme der Extinktion aufwies zur Aktivitätsberechnung verwendet.

⁷Zur Vereinfachung werden die Porengrößen in der Regel in kDa angegeben und beziehen sich auf den Durchmesser eines annähernd globulären Proteins.

3.12 Theoretische Grundlagen der Röntgenkristallographie

Ein Kristall ist ein sich in drei Dimensionen periodisch wiederholender, geordneter Körper. Die sich wiederholende Einheit nennt man Einheitszelle. Aufgrund der Symmetrien im Kristall ist es bei der Strukturaufklärung in der Regel nicht nötig, die gesamte Einheitszelle zu betrachten. Die Strukturbeschreibung reduziert sich daher auf die so genannte asymmetrische Einheit, deren Inhalt in der Strukturdatenbank hinterlegt wird. Im Falle von Faktor XIII befinden sich darin zwei FXIII-Monomere. Da die beiden Monomere identisch sind, jedoch keine Kristallsymmetrie diese Beziehung beschreibt, spricht man in diesem Fall von einer nichtkristallographischen Symmetrie. Diese kann bei der Verfeinerung der Struktur verwendet werden.

Da nicht jede beliebige Packung von Proteinen in einem Kristall möglich ist, gibt es 65 verschiedene Raumgruppen⁸, die die entsprechende Anordnung der Moleküle in einem Kristall beschreiben. In dieser Arbeit werden zwei verschiedene Raumgruppen erwähnt: $P2_1$ und $P2_12_12$. Die monokline Raumgruppe $P2_1$ zeichnet sich durch drei ungleich lange Seiten und nur zwei 90° -Winkel ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ und $\gamma \neq 90^\circ$) aus. Des Weiteren existiert eine 2_1 -Schraubenachse entlang der c -Achse. $P2_12_12$ hingegen ist eine orthorhombische Raumgruppe, was bedeutet, dass die Einheitszelle drei 90° -Winkel und drei ungleich lange Seiten ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$) aufweist. Hier findet man entlang der c - und der b -Achsen eine 2_1 -Schraubenachse, sowie eine 2-zählige Achse entlang a .

Die Theorie der Röntgenbeugung durch einen Proteinkristall stellten W.L. Bragg und W.H. Bragg 1913 auf [54]. Sie beschrieben einen Kristall als periodisch angeordnete Gitternetzebenen und konnten so zeigen, dass nur an bestimmten Stellen scharf abgegrenzte Maxima entstehen können. Die Orte, an denen diese auftreten, werden durch folgende Gleichung beschrieben:

$$n * \lambda = 2d \sin(\theta)$$

Dabei ist n eine natürliche Zahl, λ die Wellenlänge der verwendeten, monochromatischen Röntgenstrahlung, d der Abstand zwischen zwei benachbarten Gitternetzebenen und θ der Winkel, unter welchem die Röntgenstrahlen einfallen bzw. reflektiert werden. In einem Kristall lassen sich aber verschiedene Gitternetzebenen definieren und bei jeder Anordnung bildet sich ein neuer Reflex. Deshalb erhalten die gemessenen Reflexe abhängig von der Lage der Gitternetzebenen einen Zahlentripel, die so genannten Miller Indices h , k und l .

3.12.1 Möglichkeiten der Beschreibung der thermischen Bewegung

Die thermische Schwingung der Atome führt zu einer geringeren Intensität der gestreuten Strahlung bei großen Streuwinkeln. Um bewegliche Teile eines Proteins besser beschreiben zu können und einen Parameter für die Güte der Elektronendichte eines einzelnen Atoms zu besitzen, wurde der Temperaturfaktor B eingeführt.

$$B = 8\pi^2 u^2$$

Dabei steht u^2 für die mittlere quadratische Abweichung eines Atoms von seiner Ruheposition. Somit schwingt ein Atom mit einem Temperaturfaktor von 79 \AA^2 mit einer mittleren Abweichung von 1 \AA und bei einem Temperaturfaktor von 20 \AA^2 mit

⁸Theoretisch existieren 230 verschiedene Raumgruppen, die aber teilweise auch Symmetrieelemente wie Spiegelebenen und Inversionszentren enthalten, welche in Proteinkristallen nicht vorkommen können.

einer mittleren Abweichung von $0,5 \text{ \AA}$ um seine Ruheposition. Der Temperaturfaktor hat über die Strukturformfaktoren, in deren Berechnung er über den Korrekturfaktor k eingeht, einen indirekten Einfluss auf die berechneten Elektronendichtekarten.

Bei der Betrachtung des Temperaturfaktors fällt auf, dass ein Atom per Definition in alle Richtungen gleich stark schwingt, was mit einer Kugel deren Radius proportional zum Temperaturfaktor ist, grafisch dargestellt werden kann. Da in der Regel eine solche isotrope Schwingung die Ausnahme darstellt, müsste die Bewegung der Atome mit einem anisotropen Temperaturfaktor beschrieben werden. Dieser besteht aus sechs Termen, wobei die gemischten Glieder U_{12} , U_{23} und U_{13} die Lage eines Ellipsoids relativ zu den reziproken Achsen beschreiben. Die geraden Glieder U_{11} , U_{22} und U_{33} beschreiben die mittleren Abweichungsquadrate des schwingenden Atoms um seine Ruheposition in Richtung der Hauptachsen des Ellipsoids. Der anisotrope Temperaturfaktor bietet zwar die bessere Beschreibung der thermischen Bewegung der Atome, man erkaufte sich aber diesen Vorteil mit fünf zusätzlichen Parametern, die mit verfeinert werden müssen. Deshalb findet man die anisotropen Temperaturfaktoren meist nur in Strukturen hoher Auflösung, die ein entsprechend hohes Verhältnis von Observablen (gemessene, einzigartige Reflexe) zu Variablen aufweisen⁹.

Eine elegante Kombination von guter Beschreibung der thermischen Bewegung und einer begrenzten Anzahl zusätzlicher Parameter ist die Verwendung von TLS-Parametern [55, 56]. Dabei wird eine Gruppe von Atomen zu einem starren Körper zusammengefasst, dessen Bewegung dann mit insgesamt 20 Parametern beschrieben wird. Die Idee dahinter beruht auf der Tatsache, dass sich die Bewegung eines starren Körpers stets mit einer Verschiebung und einer anschließenden Rotation beschreiben lässt. Ist die Rotation klein, kann auch diese näherungsweise als eine weitere Verschiebung betrachtet werden. Die Abkürzung TLS stammt dabei von den Anfangsbuchstaben der drei beschriebenen Bewegungen: Verschiebung (eng.: **T**ranslation), Oszillation (**L**ibration) und schraubenförmige Verdrehung (**S**crew-rotation). Dabei beschreibt die Verschiebung eine Bewegung entlang einer Achse und die Oszillation eine kreisförmige Bewegung. Die schraubenförmige Verdrehung ist eine Kombination aus den beiden anderen Bewegungsarten. Somit ergeben sich für jede TLS-Gruppe je 6 Parameter für den T- und den L-Term, 8 Parameter für den S-Term und drei Parameter für einen festen Bezugspunkt.

Im Falle von Faktor XIII gibt es zwei offensichtliche Varianten der Definition von TLS-Gruppen. Der einfachste Weg ist das Zusammenfassen von je einem Monomer zu einer solchen Gruppe. Dieser Ansatz ist jedoch recht simpel und brachte daher nur geringe Verbesserungen in den Qualitätsindikatoren der Struktur. Die zweite Variante ist die Betrachtung von jeder einzelnen Domäne als einen starren Körper, wobei anzumerken ist, dass eine TLS-Gruppe alle Atome einer Domäne umfasst. Diese Variante ergab signifikant bessere Strukturen und wurde deshalb bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Faktor XIII-Strukturen angewendet. Somit ergab sich folgende Einteilung:

⁹Üblicherweise werden 4 Parameter (x , y , z und B) pro Atom verfeinert, so dass sich bei Verwendung des anisotropen Temperaturfaktors die Zahl auf 9 erhöht.

Nr. der ersten und letzten AS	TLS-Gruppennummer
A1 – A190	A1
A191 – A510	A2
A511 – A631	A3
A632 – A731	A4
B1 – B190	B1
B191 – B510	B2
B511 – B631	B3
B632 – B731	B4

Wie man sehen kann, wurde das Aktivierungspeptid zusammen mit der ersten Domäne als ein starrer Körper betrachtet. Andererseits gäbe es auch gute Gründe für eine Trennung der beiden Abschnitte. Da das Aktivierungspeptid aber nur 37 teilweise weniger gut in der Elektronendichte sichtbare Aminosäuren umfasst, erschien es für eine eigene TLS-Gruppe zu klein. Außerdem ist es keine eigenständige Domäne und kann nicht als ein an sich starrer Körper betrachtet werden. Dies ist aber eine Voraussetzung für die sinnvolle Anwendung von TLS-Parameter. So ergaben sich zwei Möglichkeiten: Den Ausschluss dieser 37 Reste von der TLS-Verfeinerung oder eine gemeinsame Betrachtung mit der 153 Aminosäuren umfassenden Domäne 1. Nach Abwägung der Fakten wurde sich für die letztgenannte Variante entschieden.

Weiterhin sollte erwähnt werden, dass sich die Verwendung von TLS-Parametern natürlich auf die atomaren Temperaturfaktoren und somit auch auf den für jede in dieser Arbeit beschriebene FXIII-Struktur angegebenen mittleren Temperaturfaktor auswirkt. So sank dieser durch den Einsatz von TLS-Parametern z. B. im Falle der hochaufgelösten FXIII-Struktur mit Calcium von $37,8 \text{ \AA}^2$ auf $23,1 \text{ \AA}^2$. Deshalb wäre ein direkter Vergleich dieser Werte mit anderen Strukturen nicht sinnvoll, wenngleich eine Berechnung der atomaren Temperaturfaktoren inklusive TLS-Anteil möglich ist.

3.12.2 Der anomale Effekt

Unter dem Namen Friedel's Gesetz¹⁰ ist die Tatsache, dass die Intensität jedes Reflexes mit den Miller-Indices hkl gleich der Intensität des Reflexes $-h-k-l$ ist, bekannt geworden.

$$I_{hkl} = I_{-h-k-l}$$

Da jedoch jedes Atom auch Röntgenstrahlung spezifischer Wellenlänge absorbiert, kommt es zu Abweichungen von diesem Gesetz. Fast alle in Proteinen vorkommenden Atome weisen bei den üblicherweise verwendeten Wellenlängen um 1 \AA keine messbare Absorption auf. Durch Einbringen entsprechender Atome und der Wahl einer geeigneten Wellenlänge kann man aber Abweichungen in den Intensitäten I_{hkl} und I_{-h-k-l} von einigen Prozent erreichen. Diese Information kann u. a. für die Phasenbestimmung oder zur Lokalisation von schwach gebundenen Liganden genutzt werden.

Bei Röntgenstrahlung bestimmter Wellenlänge interferiert die eintreffende elektromagnetische Strahlung mit der Schwingung der gebundenen Elektronen eines bestimmten Atoms. Dieser Effekt, die so genannte anomale Dispersion, beeinflusst der atomaren Formfaktor f dieses Atoms:

$$f = \frac{\omega^2}{\omega^2 - \omega_i^2 - ik\omega}$$

¹⁰Benannt nach Georges Friedel (1865–1933), der 1913 diese Regel aufstellte. [57]

wobei ω die Frequenz der einfallenden Strahlung ist, ω_i die Resonanzfrequenz und k ein Dämpfungsfaktor. Wenn ω gleich ω_i ist, wird der kleine imaginäre Teil des Formfaktors $ik\omega$ wichtig. Dies führt zu einer höheren Gewichtung des komplexen Anteils des Formfaktors f^Δ gegenüber dem realen Anteil f^0 . Der Unterschied zwischen beiden ist bedeutend: Der reale Anteil f^0 ist unabhängig von der Wellenlänge des eintreffenden Röntgenstrahls, wird aber mit höheren Streuwinkeln kleiner. Der komplexe Anteil f^Δ ist dagegen stark von der Wellenlänge, jedoch nicht vom Streuwinkel abhängig, da er die Interaktion mit den Kernelektronen beschreibt [58]. Der atomare Formfaktor kann deshalb wie folgt beschrieben werden:

$$f = f^0 + |f^\Delta|e^{i\delta} = f^0 + f' + if''$$

wobei f' den realen und f'' den imaginären Anteil der anomalen Streuung f^Δ beschreibt. Die Beziehung zwischen f' und f'' wird durch die Kramers-Kronig-Gleichung beschrieben [59].

$$f'(\omega) = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{\omega' f''(\omega') d\omega'}{\omega^2 - \omega'^2}$$

3.12.3 Qualitätsindikatoren einer Struktur

Im Verlaufe einer Strukturbestimmung interpretiert der Kristallograph die berechnete Elektronendichte. Es liegt in seinem Ermessen zu beurteilen, was „richtige“ Elektronendichte und was aufgrund von beispielsweise Messfehlern „falsche“ Elektronendichte ist. Zur objektiven Beurteilung der Struktur wurde ein relativ unabhängiger Parameter eingeführt, der über die Größe der Differenzen zwischen experimentell bestimmten und anhand des erstellten Modells berechneten Strukturamplituden Aussagen zulässt. Dieser R-Faktor ist wie folgt definiert:

$$R = 100 * \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$$

Dabei stehen $|F_{\text{obs}}|$ für die experimentell bestimmte Strukturamplitude eines Reflexes und $|F_{\text{calc}}|$ für die aus der Struktur berechnete Amplitude dieses Reflexes. Der R-Faktor beschreibt demnach die Summe der prozentualen Abweichungen der berechneten von den gemessenen Reflexamplituden. Um zu vermeiden, dass sich im Laufe der Verfeinerung das Strukturmodell nur den fehlerbehafteten experimentellen Daten und nicht der wahren Struktur annähert, werden einige Reflexe¹¹ vor der Verfeinerung ausgeklammert und deren Intensitäten von den Verfeinerungsprogrammen nicht berücksichtigt. Diese Reflexe werden zur Berechnung des freien R-Faktors (R_{free}) verwendet, der zur Evaluierung des Strukturmodells dient [60]. Im Idealfall sind R- und freier R-Faktor gleich groß. In der Realität ist der R-Faktor etwas kleiner, da die ihm zugrunde liegenden Reflexe bei der Verfeinerung als Zielvorgaben wirken. Eine zu große Differenz zwischen den beiden, so genanntes Overfitting, gilt es zu vermeiden.

Eine weitere wichtige Methode zur Beurteilung der Qualität einer Struktur ist der Ramachandran-Plot [61]. Darin werden die Aminosäuren nach ihren Hauptketten-Torsionswinkeln Φ und Ψ in ein Diagramm eingetragen, wobei aufgrund der vorhandenen Seitenkette nur bestimmte Kombinationen von Φ und Ψ sterisch erlaubt sind. Ausgenommen von der Betrachtung sind dabei aus offensichtlichen Gründen

¹¹Wie viele Reflexe für die Berechnung des freien R-Faktors zu Beginn aus dem für die Verfeinerung genutzten Satz an Reflexen entnommen werden sollen, ist nicht genau festgelegt. Bei den im Zuge dieser Arbeit verfeinerten Strukturen wurden dafür stets mehr als 1000 Reflexe verwendet. Diese Anzahl entspricht in den verschiedenen Strukturen einem Anteil zwischen 1,5% und 3% aller gemessenen Reflexe.

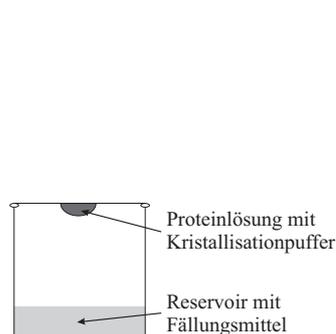


Abbildung 3.3: Kristallisation im hängenden Tropfen.

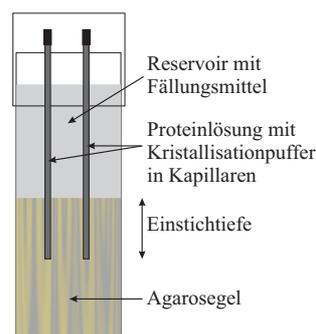


Abbildung 3.4: Kristallisation über Agarosegel.

Glycine und Proline. Zum Erstellen der Ramachandran-Plots wurde in dieser Arbeit das Programm PROCHECK [62] verwendet. In den damit erzeugten Diagrammen sind alle Aminosäuren außer Glycin als schwarze Quadrate und die Glycine als schwarze Dreiecke dargestellt. Die im verbotenen bzw. großzügig erlaubten Bereich liegenden Aminosäuren sind als rote Quadrate markiert und werden auch rot aufgelistet.

3.13 Kristallisation von Faktor XIII

Die Grundvoraussetzung einer Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie sind Proteinkristalle. Zur Kristallisation von Proteinen, ein Schritt, der sich oft als der eigentliche Flaschenhals dieser Methode herausstellt, wurden verschiedene Methoden entwickelt.

Seine Stabilität bezieht der Kristall aus der Tatsache, dass die einzelnen Proteinelemente ihre Bewegungsfreiheit zugunsten nichtkovalenter Bindungen mit Nachbarmolekülen aufgeben. Dies offenbart ein Problem: Es mag für ein Proteinelement energetisch günstig sein, sich einem Kristall anzuschließen, aber dieser muss sich erst einmal bilden. Aus diesem Grund erhöht man die Proteinkonzentration im Kristallisationsansatz durch den Entzug von Lösungsmittel bis man eine übersättigte Lösung erhält, in der sich erste Kristallisationskeime bilden können. Diese wachsen im Idealfall anschließend zu großen, geordneten Kristallen heran. Das Kristallwachstum verringert wiederum die Proteinkonzentration, was die Bildung weiterer Kristallkeime unterbindet.

3.13.1 Kristallisation im hängenden Tropfen

Die am weitesten verbreitete Methode ist die in Abbildung 3.3 dargestellte Kristallisation im hängenden Tropfen. Dabei hängt ein Tropfen eines Gemisches aus Protein- und Reservoirlösung, die das Fällungsmittel und den Puffer enthält, an einem Deckglaschen über dem Reservoir in einem luftdicht abgeschlossenen Gefäß. Die Deckglaschen sind mit einer hydrophoben Oberfläche versehen — üblicherweise erfolgt dies durch Silikonisierung — um die Interaktion zwischen Deckglaschen und Proteintropfen möglichst gering zu halten.

Per Dampfdiffusion wird dem Tropfen Wasser entzogen¹², da die Konzentration an Puffer und Fällungsmittel im Reservoir über der im Tropfen liegt. Im Zuge dessen steigen im Tropfen sowohl die Proteinkonzentration als auch die des Fällungsmittels

¹²Voraussetzung dafür ist ein höherer Dampfdruck der Proteinlösung.

an. Nach Überschreiten der Löslichkeitsgrenze des Proteins kommt es zur Übersättigung der Lösung und die Nucleation beginnt. Durch die Bildung der Nuclei sinkt die Proteinkonzentration und die vorhandenen Nuclei wachsen zu Kristallen heran. Leider ist der gesamte Prozess von sehr vielen Parametern abhängig, so dass es trotz gleicher Rahmenbedingungen stets zu etwas unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann.

Im Falle von monoklinen Faktor XIII-Kristallen bestand das Reservoir aus 500 μl 0,1 M MES, pH 6,1–6,5. Über dieser Lösung wurden eine Mischung aus 2 μl Faktor XIII mit 2,15 mg/ml in wässrigem Puffer¹³ und 2 μl Reservoir platziert. Dieser Ansatz wurde bei 20 °C ruhig stehen gelassen. In der Regel erschienen erste Kristalle innerhalb einer Woche, welche für das Erreichen ihrer endgültigen Größe bis zu 3 Wochen benötigten. Die orthorhombischen Kristalle wuchsen bei zwei verschiedenen Kristallisationsbedingungen. Das Reservoir enthielt 20 mM MES pH 5,6 und 18 % Ammoniumsulfat bzw. 10,5 % (w/v) Ammoniumacetat pH 7,4. In beiden Fällen wurde Faktor XIII in einer Konzentration von 4,3 mg/ml verwendet. Bei 20 °C waren schon nach wenigen Tagen erste Kristalle zu sehen, die nach ca. einer Woche ihre endgültige Größe erreichten.

3.13.2 Kristallisation über Agarosegel

Für die Experimente in der Schwerelosigkeit war es wegen der starken Erschütterungen bei Start und Landung des Space Shuttles notwendig, auf eine andere Kristallisationsmethode zurückzugreifen. Zur Anwendung kam die Agarosegel-Akupunktur-Methode, welche von J.M. Garcia-Ruiz 1993 vorgestellt wurde [63]. Dabei wird die in einer Kapillare eingeschlossene Proteinlösung von dem Reservoir durch ein Agarosegel getrennt (siehe Abbildung 3.4). Durch die entsprechende Wahl der Agarosekonzentration kann das in der Kapillare befindliche Protein am Austreten gehindert werden.

Mit der Zeit diffundiert das im Reservoir gelöste Fällungsmittel in das Gel und anschließend in die Kapillare, so dass es zu einem langsamen Anstieg der Fällungsmittelkonzentration und gleichzeitig zu einem Gradienten entlang der Kapillare kommt. Dabei kann durch Variation der Geldichte und der Einstichtiefe (siehe Abb. 3.4) der Zeitpunkt des Zusammentreffens von der in der Kapillare befindlichen Proteinlösung und des sich durch das Gel per Diffusion ausbreitende Fällungsmittel beeinflusst werden. Wird die für die Nucleation notwendige Konzentration des Fällungsmittels in der Proteinlösung erreicht, können sich Kristalle bilden und bis zum Ausfüllen der gesamten Kapillare wachsen.

Bedingt durch die Tatsache, dass für die Kristallisation von Faktor XIII das Volumen des Reservoirs dem des Agarosegels entsprach, musste die Konzentration des MES-Puffers relativ zur Kristallisation im hängenden Tropfen verdoppelt werden. Somit wurde eine 0,2 molare Lösung von MES mit einem pH-Wert von 6,3 verwendet und Faktor XIII in Konzentrationen von 2,15 und 4,3 mg/ml eingesetzt.

3.14 Abkühlen der Proteinkristalle auf 100 K

Um die Strahlungsschäden, die durch die Bildung von Radikalen und deren unspezifischer Reaktion mit Proteinmolekülatomen entstehen, im Kristall möglichst gering zu halten, werden Proteinkristalle häufig bei einer Temperatur von 100 K vermessen. Ein einfaches Abkühlen des Proteinkristalls auf diese Temperatur führt in der Regel jedoch zu Eiskristallen, welche nicht nur die Kristallordnung stören, sondern auch selbst Reflexe auf dem Detektor erzeugen. Deshalb soll möglichst das

¹³Die genaue Zusammensetzung der Faktor XIII-Stammlösung wurde von der Firma Centeon nicht mitgeteilt. Die Verdünnung auf die gewünschte Proteinkonzentration erfolgte mit Wasser.

gesamte Wasser glasartig, d.h. ungeordnet erstarren. Um dieses Ziel zu erreichen, muss der Kristall möglichst schnell abgekühlt werden. Da es praktisch unmöglich ist in wenigen Millisekunden von 300 K auf 100 K abzukühlen, muss das Zeitfenster auf ca. 1 Sekunde verlängert werden. Aus diesem Grund verwendet man Zusätze wie Glycerin, Polyethylenglycole verschiedener Kettenlängen oder auch Salze, die der Eiskristallbildung entgegenwirken sollen.

Im Falle von monoklinen Faktor XIII-Kristallen, wurde Glycerin in einer Konzentration von 30 % verwendet. Dazu musste eine dem Reservoir entsprechende Lösung hergestellt werden, welche zusätzlich 30 % Glycerin enthielt. Diese Lösung wurde anschließend sukzessive dem Tropfen mit dem Kristall zugesetzt, so dass die Glycerin-Konzentration langsam auf 30 % anstieg. Nach ca. einer Stunde wurden die Kristalle direkt in den auf 100 K temperierten Kryostrahl gehalten und vermessen. Für die orthorhombischen Faktor XIII-Kristalle wurde teilweise nur eine 15 %ige Glycerinlösung benötigt, da in diesem Fall im Reservoir bereits Ammoniumsulfat bzw. -acetat enthalten waren.

3.15 Kristallvermessung und Datenprozessierung

Die in dieser Arbeit beschriebenen Daten wurden am IMB in Jena, am Synchrotron in Triest, sowie am DESY in Hamburg gesammelt. Dabei kamen sowohl Image-Plate- als auch CCD-Detektoren zum Einsatz. Der Kristall-Detektor-Abstand und die Belichtungszeit wurden an das Streuvermögen des Kristalls angepasst, um eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen. Bei einer größeren Anzahl überladener Reflexe (so genannte Overloads¹⁴) wurde die Messung wiederholt. Des Weiteren musste der Oszillationswinkel so gewählt werden, dass es nicht zu einem Überlappen der Reflexe (sog. Overlaps) kam, bzw. deren Anzahl minimiert wurde. Üblicherweise wurden bei ausreichend vorhandener Zeit 360 ° in 0,5 °-Schritten vermessen.

Die vom Röntgendetektor gesammelten Rohdaten müssen vor dem Berechnen einer Elektronendichtekarte ausgewertet und wichtige Parameter, z. B. Dimensionen der Elementarzelle, Symmetrie des Kristalls und Orientierung des Kristalls im Raum relativ zum Röntgenstrahl, aus den Positionen der Reflexe auf dem Detektor bestimmt werden. Dafür wurden die Programme DENZO und SCALEPACK, bzw. Programme aus der Programmsammlung CCP4 verwendet. Die besonders intensiv genutzten Programme und die damit verbundenen Arbeitsschritte sollen im Folgenden näher erläutert werden.

3.15.1 SCALA

Nach der Datensammlung mussten in der Regel verschiedene Datensätze vereinigt werden. Eine einfache Addition und Mittelwertberechnung wäre jedoch nicht der richtige Weg, da es aufgrund verschiedener Ursachen z. B. zu einer verminderten Intensität aller Reflexe kommen kann. Deshalb ist es besser, die einzelnen Datensätze aneinander zu skalieren und erst danach mehrfach gemessene Reflexe zu mitteln. Diese Aufgabe übernahm häufig das Programm SCALA, welches besonders bei der Analyse der anomalen Daten (siehe Abschnitt 4.1.3) deutlich bessere Ergebnisse lieferte als das vergleichbare Programm SCALEPACK. Dieses wurde jedoch immer zur genauen Bestimmung der Einheitszelle verwendet.

¹⁴Jeder Detektor hat nur einen gewissen dynamischen Messbereich. Wird der Detektor mit einer größeren als der maximal messbaren Intensität bestrahlt, kommt es zum Überladen des Detektors. Die Intensität von Overloads kann später nur noch abgeschätzt werden, weshalb in der Regel die Messung mit einer kürzeren Belichtungszeit wiederholt wird.

3.15.2 TRUNCATE

Die Umwandlung der Reflexintensitäten in Strukturamplituden und die Analyse der Daten erledigte das Programm TRUNCATE. Eine der erstellten Statistiken ist der nach seinem Erfinder benannte Wilson-Plot [64]. In diesem Diagramm ist die Abhängigkeit der Reflex-Intensitäten von der Auflösung dargestellt, die bei einer gleichmäßigen Verteilung aller Atome in der Einheitszelle stetig geringer werden muss. Bei einer entsprechenden Darstellung, ergibt sich ein linearer Abfall, wobei der Betrag der Steigung proportional zu dem Temperaturfaktor der Daten ist. In der Realität muss ab einer Auflösung von ungefähr 3,5 Å die Intensität mit steigender Auflösung konstant fallen. War dies nicht der Fall, wurden die Daten nur bis zu einer Auflösung ausgewertet, bei der diese Regel noch galt. Der Betrag des berechneten Gradienten dieses Intensitätsabfalls ist als Wilson-Plot-Temperaturfaktor bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Datensätzen angegeben. Ähnlich wurde mit der Vollständigkeit und dem Signal-Rausch-Verhältnis verfahren. In der höchsten Auflösung musste Letzteres mindestens bei 2 liegen und die Vollständigkeit sollte 50 % nicht unterschreiten. Bei den in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen war dies niemals der Fall war.

3.15.3 AMORE

Bei der Phasenbestimmung der orthorhombischen Strukturen war die Methode des molekularen Ersatzes notwendig. Dafür wurde das Programm AMORE verwendet. Beim molekularen Ersatz nimmt man eine ähnliche Struktur und sucht mit dieser Struktur und den experimentell bestimmten Amplituden nach Phasen. Dies erfolgt im ersten Schritt über eine Eigenrotationsfunktion und einer anschließenden Verschiebung. Da sich das Dimer in der asymmetrischen Einheit in der monoklinen Struktur von dem in der orthorhombischen Struktur unterscheidet, erfolgte die Phasenbestimmung in zwei Schritten mit dem bekannten Monomer. Zunächst wurde nach einer möglichen Position des Monomers in der asymmetrischen Einheit gesucht, diese Position fixiert und abschließend die Position des noch fehlenden Monomeres bestimmt.

3.15.4 REFMAC

Die Interpretation der Elektronendichte ist neben der Kristallisation von Proteinen eine der Hauptaufgaben eines Kristallographen. Allerdings kann er dabei nur die Aminosäuren in die Elektronendichtewolken einbauen, ohne dabei auf Bindungslängen und -winkel im Detail Rücksicht zu nehmen und vor allem ohne die Auswirkungen seines Tuns auf die Phasenberechnung kontrollieren zu können. Dies erledigen so genannte Verfeinerungsprogramme. Diese können auf eine umfangreiche Bibliothek voller Parameter wie beispielsweise bevorzugte Torsionswinkel zurückgreifen und führen eine Art Energieminimierung der Proteinstruktur unter Berücksichtigung der experimentell bestimmten Amplituden und Phasen durch. Für die Faktor XIII-Strukturen wurde dafür das Programm REFMAC verwendet¹⁵. Mit diesem Programm wurde auch die Bestimmung der TLS-Parameter durchgeführt, welche am Ende der Verfeinerungen zum Einsatz kamen (siehe Abschnitt 3.12.1). Dafür wurden diese in 20 Zyklen verfeinert und anschließend zur „normalen“ Verfeinerung verwendet.

¹⁵Dabei ist anzumerken, dass anfangs bei den monoklinen Strukturen mit CNS gearbeitet wurde. Der Anteil von CNS an den Verfeinerungsrunden dieser Strukturen lag insgesamt allerdings unter 20 %.

3.15.5 ESCET

Das Programm ESECT [65, 66] wurde freundlicher Weise von Th.R. Schneider zur Verfügung gestellt. Es vergleicht die intramolekularen Atomabstände verschiedener, einander ähnlicher Strukturen und identifiziert damit die strukturell invariablen Teile. Dabei berücksichtigt ESCET auch, wie genau die Position der jeweiligen Atome bestimmt worden ist. Zu diesem Zweck berechnet es zunächst den Koordinatenfehler nach Cruickshank *et al.* [67]:

$$DPI = \sqrt{\frac{N_i}{n_{obs}}} \sqrt[3]{\frac{1}{C}} R_{free} d_{min}$$

In dieser Gleichung steht DPI für den Koordinatenfehler der Struktur (**D**iffraction **P**recision **I**ndicator), N_i für die Anzahl der Atome, n_{obs} für die Anzahl der einzigartigen Reflexe, C für die Vollständigkeit und d_{min} für die Auflösung. Im Falle von FXIII ergaben sich Koordinatenfehler zwischen 0,05 Å und 0,273 Å. Durch Multiplikation dieses Koordinatenfehlers mit dem Quotienten aus dem Temperaturfaktor eines bestimmten Atoms und dem durchschnittlichen Temperaturfaktor der Struktur erhält man eine Abschätzung für die Unsicherheit der angegebenen Position dieses Atoms, auch als abgeschätzte Standardabweichung bezeichnet. Dieser Wert wird bei der Berechnung der Differenzmatrix berücksichtigt, so dass eine zuverlässige Aussage über Strukturunterschiede zwischen zwei Strukturen möglich ist. Zusätzlich werden mit Hilfe aller Vergleiche die Bereiche der Struktur identifiziert, die nicht ihre Position ändern und somit zum invarianten Teil der Struktur zählen.

Es wurden alle 12 im Zuge dieser Arbeit verfeinerten Monomer-Strukturen miteinander verglichen, um für die Bestimmung der unveränderlichen Strukturelemente eine möglichst breite Datenbasis zu verwenden. Da in den Strukturen teilweise einige Aminosäuren fehlen, wurden nur die Bereiche Phe8–Leu31, Glu43–Thr508 und Asn517–Arg727 für den Vergleich berücksichtigt. Auf ein Hinzuziehen weiterer Faktor XIII-Strukturen wurde bewusst verzichtet, um mögliche Einflüsse z. B. durch andere Verfeinerungsprogramme auszuschließen. Diese mögen zwar nur gering sein, aber bei den ohnehin geringen Unterschieden zwischen den Strukturen würde dies eine nicht unerhebliche Fehlerquelle darstellen.

3.15.6 Sonstige, häufig verwendete Programme

Alle abgebildeten Sequenzvergleiche wurden mit dem im Internet angebotenen Programm MULTALIN¹⁶ [68] erstellt. Die Aminosäuren werden dabei anhand ihren Eigenschaften verglichen, wobei konservierte Positionen¹⁷ in der grafischen Darstellung rot und teilweise konservierte Positionen blau abgebildet werden.

Fast alle Bilder von Proteinstrukturen wurden mit den Programmen MOLSCRIPT [69] und RASTER3D [70] erstellt.

Mit dem Programm Rmerge von M.S. Weiss wurden die verschiedenen R-Faktoren für jeden Datensatz errechnet. Es sind dies der schon Jahrzehnte benutzte R_{merge} [71] und die neueren R_{rim} [72, 73] und R_{pim} ¹⁸ [73]. Zum Vergleich sind im Folgenden die mathematischen Formeln zur Berechnung der verschiedenen R-Faktoren aufgelistet.

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \overline{I(hkl)}|}{\sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)}$$

¹⁶<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>

¹⁷Konserviert bedeutet in diesem Fall, dass nur identische oder fast identische Aminosäuren, wie z. B. Valin und Isoleucin, an dieser Position vorkommen.

¹⁸ R_{rim} steht für redundancy-independent merging R-factor und R_{pim} bedeutet precision-indicating merging R-factor.

$$R_{\text{rim}} = \sum_{hkl} \sqrt{\frac{N}{N-1}} \sum_i | I_i(hkl) - \overline{I(hkl)} | / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

$$R_{\text{pim}} = \sum_{hkl} \sqrt{\frac{1}{N-1}} \sum_i | I_i(hkl) - \overline{I(hkl)} | / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl)$$

Der klassische R_{merge} soll die Unterschiede zwischen Mehrfachmessungen eines Reflexes verdeutlichen. Da sich in ihm jedoch nicht widerspiegelt, dass eine hohe Redundanz einen verlässlicheren Mittelwert ergibt, wurde der R_{rim} eingeführt. Dieser enthält den Faktor $\sqrt{\frac{N}{N-1}}$ und bestraft damit eine niedrige Redundanz mit einem höheren R-Faktor. Der R_{pim} wiederum gibt an, wie genau der Mittelwert bestimmt worden ist.

Die Kristall- und Dimerkontakte wurden mit dem Programm CONTACT bestimmt, wobei nur die klassischen Kontakte berücksichtigt wurden und hydrophobe Wechselwirkungen oder beispielsweise C-H- π Kontakte keine Beachtung fanden. Der Maximalabstand zwischen Donor und Akzeptor wurde auf 3,60 Å festgesetzt. Die Listen der Kontakte mussten anschließend überarbeitet und aufgetretene Fehler¹⁹ beseitigt werden.

Die Bestimmung der Sekundärstruktur anhand der Hauptkettentorsionswinkel erfolgte mit dem Programm DSSP [74]. Es wurde dabei auf eine nachträgliche Bearbeitung der Ausgabe verzichtet, um eine möglichst neutrale Beschreibung der Sekundärstruktur zu erhalten.

Das Programm LSQKAB [75] diente schließlich zur paarweisen Überlagerung der verschiedenen FXIII-Strukturen und der Analyse der Strukturunterschiede.

¹⁹Es wurden von dem Programm beispielsweise auch nahe stehende Hauptkettensauerstoffatome als Kontakte aufgelistet, die aber unmöglich einen solchen direkt bilden können.

Kapitel 4

Ergebnisse

4.1 Kristallisation von Faktor XIII in der monoklinen Kristallform

Die für die hier vorliegende Arbeit gezüchteten monoklinen Kristalle wurden entsprechend den Angaben in [46] gewonnen. Unter Verwendung der Methode der Kristallisation im hängenden Tropfen (siehe 3.13.1) wurden in der Regel $2\ \mu\text{l}$ Faktor XIII mit $2\ \mu\text{l}$ Reservoir gemischt, was nach ca. einer Woche zu Kristallen führte. Versuche mit größeren Volumina mit bis zu $40\ \mu\text{l}$ Tropfen, führten zu sehr großen, gut aussehenden Kristallen von bis zu $700\ \mu\text{m}$ Kantenlänge. Allerdings war der Materialverbrauch unverhältnismäßig hoch und es gab gerade bei den großen Kristallen Probleme mit dem Abkühlen auf 100 K. Des Weiteren konnten durch Variation der Pufferkonzentration, der Kristallisationstemperatur, der Proteinkonzentration oder des Mischungsverhältnisses von Proteinlösung zu Reservoir im Tropfen keine Verbesserung in der Kristallisation erreicht werden. Die Kristallisationsansätze wurden stets mit 1 M MES-Puffer-Stammlösungen der pH-Werte 6,2, 6,3, 6,4, bzw. 6,5 pipettiert. Es ergab sich in Bezug auf Größe und Anzahl der Kristalle immer ein pH-Optimum, welches allerdings beim Vergleich verschiedener Kristallisationsplatten nicht immer dem gleichen pH-Wert zuzuordnen war.

In der Regel war besonders bei den niedrigen pH-Werten ein leichter Niederschlag zu beobachten, der sich sofort nach Zugabe von 0,1 M MES bildete. Ein verbreiteter Irrtum ist jedoch, dass im Falle von Faktor XIII aus diesem Niederschlag Kristalle wachsen würden. Wurden Proteinlösung und Reservoir gemischt und der Niederschlag nach etwa 20 min durch Zentrifugation abgetrennt, wuchsen

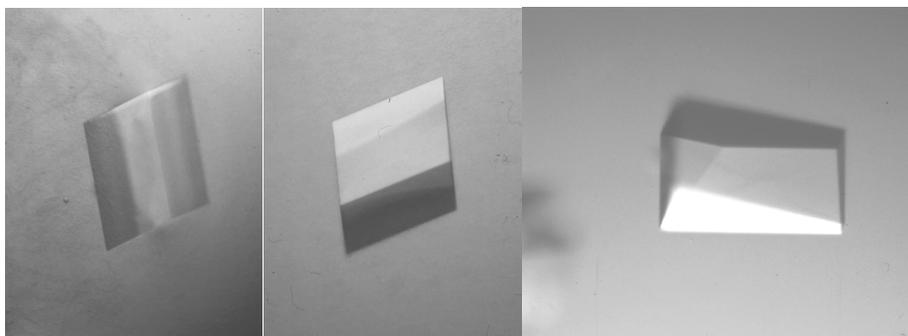


Abbildung 4.1: Beispiele monokliner Faktor XIII-Kristalle.

in der verbliebenen, klaren Lösung, welche dann für die Kristallisation im hängenden Tropfen verwendet wurde, die bekannten, formschönen Kristalle (siehe Abb. 4.1).

Auf den Tropfen bildete sich stets eine relativ feste Proteinhaut. Fast immer waren die im Tropfen gewachsenen Kristalle mit dieser Patina verbunden und mussten deshalb vor der Entnahme vorsichtig unter dem Mikroskop von dieser gelöst werden. Eine Beeinträchtigung der Streukraft durch Patinareste auf den Kristallen konnte zwar nicht beobachtet werden, aber ohne die Entfernung der Patina gestaltete sich die Handhabung der Kristalle recht schwierig. Nur selten waren am Deckgläschen haftende Kristalle zu beobachten.

In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Ergebnisse, welche unter Verwendung monokliner Kristalle erhalten wurden, vorgestellt. Es sind dies die Strukturen der nativen Form (Abschnitt 4.1.1), des hochaufgelösten Komplexes mit Calcium (Abschnitt 4.1.2) und einer Variation der nativen Struktur unter Verwendung von hohen PEG-Konzentrationen (Abschnitt 4.1.4). Des Weiteren wird auf die exakte Bestimmung der Anzahl der an Faktor XIII gebundenen Calciumionen mittels anomaler Streuung eingegangen (Abschnitt 4.1.3) sowie die Resultate der Kristallisation in der Schwerelosigkeit vorgestellt (Abschnitt 4.1.5).

4.1.1 Die native Faktor XIII-Struktur

Wie oben beschrieben, waren vor Beginn dieser Arbeit die native Struktur von Faktor XIII und der Komplex mit Calcium bereits bekannt. Da es jedoch keine gravierenden Unterschiede zwischen diesen beiden Kristallstrukturen gab, es aber eindeutig in Lösung ein struktureller Unterschied zwischen Faktor XIII mit und ohne Calcium existiert, wurden weiterführende Experimente unternommen. Zunächst musste sichergestellt werden, dass in der nativen Struktur definitiv keine Calciumionen — nicht einmal in Spuren — vorhanden sind, die die Konformation des Proteins beeinflussen könnten. Dies sollte durch die Zugabe von EDTA zum Kristallisationsansatz erreicht werden.

Die in Tabelle 4.1 aufgeführten Daten wurden von einem Kristall gesammelt, der im Beisein von 0,1 M MES, pH 6,2 und 20 mM EDTA wuchs. Zur Vorbereitung auf die Vermessung bei 100 K wurde dieser Kristall vor Beginn der Messung für eine Stunde in eine dem Reservoir entsprechende, zusätzlich jedoch 30 % Glycerin enthaltende Lösung transferiert. Insgesamt wurden 60 Bilder mit einem Rotationswinkel $\phi = 1^\circ$ und 601 Bilder mit $\phi = 0,6^\circ$ aufgenommen. Diese beiden Datensätze wurden mit DENZO prozessiert und mit SCALEPACK skaliert. Der so gewonnene Datensatz konnte mit SCALA, TRUNCATE und RMERGE¹ analysiert werden.

Trotz des hohen R_{merge} in der äußersten Schale wurden die Daten bis 1,95 Å ausgewertet, da das Signal-Rausch-Verhältnis und der in Abbildung 4.2 dargestellte Wilson-Plot² für eine Verwendung dieser Daten sprechen. Die am Ende der Verfeinerung erreichten ausgezeichneten R-Faktoren der Struktur bestätigen dies. Zu beachten ist die hohe Redundanz der Daten, die am Ende zu sehr guten Elektrendichtekarten führte.

Die bekannte Faktor XIII-Struktur wurde zur Phasenbestimmung mittels molekularen Ersatzes verwendet. Hierfür war eine so genannte Rigid-Body-Verfeinerung ausreichend. Als Vorlage diente die in [46] vorgestellte native Kryostruktur³, wobei

¹Da es bei der Unterteilung in Auflösungsgebiete bei diesen Programmen teilweise zu Differenzen kam, wurden mögliche Abweichungen in allen Tabellen diesen Typs stets in Klammern angegeben. So wurden z. B. im Falle der nativen FXIII-Struktur in der monoklinen Kristallform die R-Faktoren in der höchsten Auflösung nicht in dem Bereich 2,00 Å bis 1,95 Å berechnet, sondern der Bereich 1,98 Å bis 1,95 Å betrachtet.

²Um einen besseren Vergleich der unterschiedlichen Strukturen zu ermöglichen, sind alle abgebildeten Wilson-Plots gleich skaliert.

³Diese Struktur war die erste Faktor XIII-Struktur, die von bei 100 K vermessenen Kristallen stammte. Aufgrund der niedrigen Temperaturen sind die Dimensionen der Einheitszelle etwas kleiner als bei Raumtemperatur, was sich bei dieser Art der Phasenbestimmung störend bemerkbar machen kann.

Symmetrie		$P2_1$
Einheitszelle (a, b, c, β)	133,85 Å, 70,62 Å, 100,53 Å, 105,96°	
Lösungsmittelgehalt		52,5 %
Temperaturfaktor aus dem Wilson-Plot		31,2 Å ²
Auflösungsgrenzen in Å		∞ -1,95 (2,00-1,95)
Anzahl der beobachteten Reflexe		1 112 577 (70 437)
davon einzigartig		129 789 (9 420)
Vollständigkeit		98,7 % (97,7 %)
Redundanz		8,6 (7,5)
durchschnittliche Intensität		1814 (123)
durchschnittliches Hintergrundrauschen		69 (47)
Signal-Rausch-Verhältnis		26,3 (2,6)
R_{merge} (1,98 Å-1,95 Å)		7,2 % (82,1 %)
R_{rim} (1,98 Å-1,95 Å)		7,7 % (88,2 %)
R_{pim} (1,98 Å-1,95 Å)		2,6 % (31,9 %)

Tabelle 4.1: Ergebnis der Kokristallisation mit EDTA.

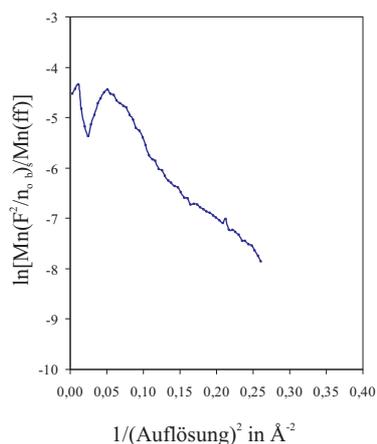


Abbildung 4.2: Wilson-Plot des nativen Datensatzes.

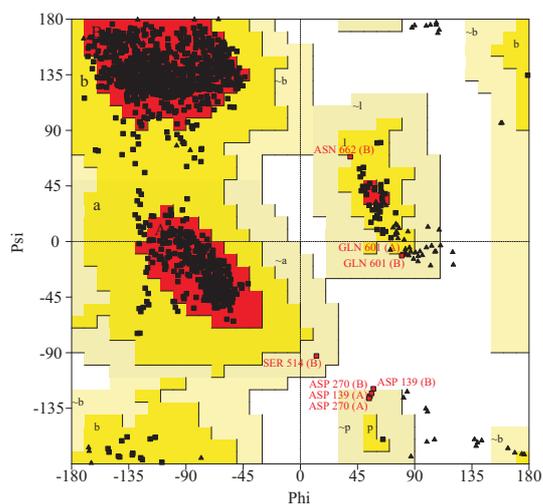


Abbildung 4.3: Ramachandran-Plot von der nativen Faktor XIII Struktur.

Anzahl der Aminosäuren	1 448
Anzahl der Wassermoleküle	1 389
rmsd Bindungen	0,018 Å
rmsd Winkel	1,584 °
durchschnittlicher B-Faktor	27,7 Å ²
R-Faktor	15,4 %
freier R-Faktor	19,5 %
Anzahl der Reflexe im Verfeinerungssatz	125 606
Anzahl der Reflexe im Testsatz	1 944

Tabelle 4.2: Auflistung der Struktur-Parameter.

die enthaltenen Wassermoleküle nicht berücksichtigt wurden. Durch Verfeinerungen mit CNS und später mit REFMAC entstand eine Struktur, die der bereits bekannten nativen Struktur recht ähnlich ist. Aus der endgültigen Struktur wurden die in Tabelle 4.2 aufgeführten Daten entnommen.

Aufgrund der bereits bekannten Unterschiede in der Beweglichkeit der beiden Monomeren (siehe [46]), wurde die in REFMAC gebotene Möglichkeit der Verfeinerung mit definierten TLS-Gruppen am Ende der Verfeinerung genutzt. Ein direkter Vergleich zwischen der Variante mit einer TLS-Gruppe pro Monomer bzw. einer TLS-Gruppe pro Domäne zeigte, dass im letztgenannten Fall die R-Faktoren sich deutlicher verringerten. Allerdings stiegen die R-Faktoren anschließend wieder und es gab Probleme mit der Verfeinerung. Erst ein Aufheben der bisher verwendeten nichtkristallographischen Symmetrie brachte eine Lösung der Probleme. Vor der Verwendung von TLS-Gruppen war es scheinbar egal, ob diese verwendet wurde oder nicht. Erst durch die unabhängige Verfeinerung der TLS-Gruppen erwies sich eine Nutzung der internen Symmetrie als kontraproduktiv.

Auffallend an der Struktur ist die recht hohe Anzahl Wassermoleküle (siehe Tabelle 4.2), welche in der Elektronendichtekarte zu finden ist⁴. Das dies jedoch kein Artefakt von so genanntem Overfitting⁵ ist, lässt sich an dem relativ niedrigen freien R-Faktor von 19,5 % erkennen. Außerdem wurden nur an den Positionen Wassermoleküle eingebaut, an denen eine ausreichende Elektronendichte ($> 2\sigma$) vorhanden war und ein Einbau aufgrund der Existenz von entsprechenden Partnern für Wasserstoffbrücken (Donoren oder Akzeptoren) sinnvoll erschien.

Die Güte der Struktur ist auch in dem in Abbildung 4.3 dargestellten Ramachandran-Plot ersichtlich. Nur 8 Aminosäuren, was etwa 0,6 % aller in die Elektronendichte eingebauter Aminosäuren mit Seitenketten entspricht, weisen Torsionswinkel im verbotenen bzw. großzügig erlaubten Bereich auf. Von diesen Aminosäuren liegen 7 (Asp139A, Asp139B, Asp270A, Asp270B, Gln601A und Gln601B) in Schlaufen, was ein häufig anzutreffender Grund für anormale Torsionswinkel ist, und sind an sich gut bis sehr gut in der Elektronendichte definiert. Auch die Konformation von Asn662B ist eindeutig definiert, so dass die schlechten Hauptkettentorsionswinkel verwundern. Noch dazu, da sich dieser Rest mitten in einem β -Strang befindet. Nur Ser514B weist keine gute Elektronendichte auf. Es liegt in einem der in der Faktor XIII-Struktur stets schlecht definierten Bereiche, dem ungeordneten Abschnitt

⁴Laut [76] sollte die Anzahl der maximal bestimmbaren Wassermoleküle in diesem Fall bei ca. 1400 liegen.

⁵Wenn man nur aufgrund der berechneten Elektronendichtekarte überall dort Atome einbauen würde, wo laut Karte eine gewisse Elektronendichte vorhanden ist, kommt man zu einem der Elektronendichtekarte sehr gut entsprechendem Modell, was jedoch nur bedingt der Wirklichkeit entspricht. Dies äußert sich in einem geringen R- aber einem hohen freien R-Faktor. Dies nennt man Overfitting. Eine Faustregel besagt, dass R- und freier R-Faktor nicht mehr als 10%-Punkte auseinander liegen sollten.

zwischen Pro505 und Met520. Aufgrund der schlechten Elektronendichte fehlen deshalb die 7 Aminosäuren zwischen Thr508A und Ser516A. Da dieser Bereich in der B-Kette besser definiert ist, sind diese Aminosäuren dort vorhanden, weisen aber hohe Temperaturfaktoren von bis zu 102 \AA^2 auf. Ein weiterer, in allen Faktor XIII-Strukturen schlecht definierter Bereich ist zwischen Glu30 und Leu45 zu finden. Auch hier führte die schlecht definierte Elektronendichte zum Fehlen der Reste zwischen Val35A und Asn40A, sowie zwischen Leu31B und Gln42B in der Struktur. Interessanterweise liegen gerade in diesen Bereichen schlechter Elektronendichte die beiden bekannten Thrombin-Schnittstellen (siehe Abschnitt 1.3.2).

Die Besonderheiten der nativen Faktor XIII-Struktur sind bereits in [45] bzw. in [46] beschrieben worden. Gemeint sind damit die cis-Peptidbindungen, der acetylierte N-Terminus und das gebundene Glycerin-Molekül. Die zwei nicht-Prolin cis-Konformationen der Hauptkette zwischen den Aminosäuren Arg310 und Tyr311, sowie zwischen Gln425 und Phe426, die zusätzlich zu dem cis-Prolin an Position 411 zu finden sind, wurden erstmals in der 1998 erschienenen Arbeit von M.S. Weiss erwähnt [45]. Diese Bereiche sind sehr gut in der Elektronendichte definiert, so dass es keinen Zweifel an den beschriebenen cis-Konformationen geben kann. Auch die in [46] beschriebenen acetylierten N-Termini und das gebundene Glycerin-Molekül sind gut in der Elektronendichte definiert. Allerdings erlaubte die höhere Auflösung der Daten eine Korrektur der Glycerin-Konformation.

4.1.2 Faktor XIII mit Calcium — eine hochaufgelöste Struktur

Nachdem bereits in einer vorangegangenen Arbeit [46] verschiedene Komplexe von Faktor XIII und Calcium vorgestellt wurden, konnte von einem dieser Komplexe später ein Datensatz bis $1,6 \text{ \AA}$ Auflösung gesammelt werden. Der dafür verwendete Kristall wurde vor der Messung für 5 Stunden in eine dem Reservoir entsprechende Lösung mit $100 \text{ mM MES pH } 6,2$ und 100 mM CaCl_2 gelegt. Anschließend wurde diese Lösung durch eine $100 \text{ mM MES pH } 6,2$, 100 mM CaCl_2 und 30% Glycerin enthaltende Lösung ausgetauscht und danach auf 100 K abgekühlt. Obwohl der Kristall mit Abmaßen von $400 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ für einen Faktor XIII-Kristall nicht übermäßig groß war, streute er am Synchrotron in Hamburg (BW7A) bis $1,6 \text{ \AA}$. Es wurden mehr als 69° mit Oszillationswinkeln von $0,75^\circ$ bzw. $0,5^\circ$ bis zu einer Auflösung von $1,6 \text{ \AA}$ gesammelt⁶. Wegen zahlreicher überladener Reflexe in der niedrigen Auflösung wurden drei weitere Datensätze bis $1,9 \text{ \AA}$ (insgesamt 90°), $2,25 \text{ \AA}$ ($91,5^\circ$) bzw. $2,48 \text{ \AA}$ (180°) gesammelt. Alle Daten wurden mit DENZO prozessiert, mit SCALEPACK anschließend zusammenskaliert und mit SCALA, TRUNCATE und RMERGE analysiert.

Die in der Tabelle 4.3 aufgelisteten Werte belegen, dass es sich um einen qualitativ hochwertigen Datensatz handelt. Leider konnten aufgrund der limitierten Messzeit nicht mehr Daten bis $1,6 \text{ \AA}$ gesammelt werden, so dass die Redundanz in der hohen Auflösung nur bei $2,7$ liegt. Die niedrigen R-Faktoren und ein auch noch in der höchsten Auflösung deutlich über 2 liegendes Signal-Rausch-Verhältnis sprechen für die Güte der Daten.

Da der Komplex mit Calcium bereits in [48] und in [46] beschrieben wurde, war keine Phasenbestimmung mit molekularem Ersatz notwendig, sondern auch in diesem Fall eine Rigid-Body-Verfeinerung mit der in [46] beschriebenen Faktor XIII-Struktur mit 100 mM Calcium ausreichend, um ein erstes Modell zu erhalten. Nach einigen Verfeinerungszyklen mit CNS wurde anschließend das Programm REFMAC verwendet. Ein Wechsel des Verfeinerungsprogrammes wurde aufgrund der größeren

⁶Im Laufe der Messung wurde aufgrund von Overlaps (siehe Abschnitt 3.15) der Oszillationswinkel von anfänglich $0,75^\circ$ auf $0,5^\circ$ verkleinert.

Symmetrie		$P2_1$
Einheitszelle (a, b, c, β)	132,84 Å, 70,94 Å, 100,54 Å, 105,84°	
Lösungsmittelgehalt		55,5 %
Temperaturfaktor aus dem Wilson-Plot		28,2 Å ²
Auflösungsgrenzen in Å		∞ -1.60 (1.64-1.60)
Anzahl der beobachteten Reflexe		1 055 259 (45 579)
davon einzigartig		234 959 (16 832)
Vollständigkeit		99,2 % (96,5 %)
Redundanz		4,5 (2,7)
durchschnittliche Intensität		3 499 (63)
durchschnittliches Hintergrundrauschen		112 (29)
Signal-Rausch-Verhältnis		31,2 (2,2)
R_{merge} (1,63 Å-1,60 Å)		4,1 % (51,9 %)
R_{rim} (1,63 Å-1,60 Å)		4,5 % (64,0 %)
R_{pim} (1,63 Å-1,60 Å)		1,8 % (37,0 %)

Tabelle 4.3: Datensatz mit 100 mM Calcium.

Anzahl der Aminosäuren	1 458
Anzahl der Wassermoleküle	1 394
Anzahl der Calciumionen	2
rmsd Bindungen	0,018 Å
rmsd Winkel	1,718°
durchschnittlicher B-Faktor	23,1 Å ²
R-Faktor	17,4 %
freier R-Faktor	19,7 %
Anzahl der Reflexe im Verfeinerungssatz	230 201
Anzahl der Reflexe im Testsatz	2 355

Tabelle 4.4: Struktur mit 100 mM Calcium.

Geschwindigkeit und der einfacheren Bedienung vorgenommen. Nach Abschluss der Struktur-Verfeinerung wurden die in Tabelle 4.4 angegebenen Werte der endgültigen pdb-Datei entnommen.

Aufgrund der guten Daten wurde für die Verfeinerung keine nichtkristallographische Symmetrie angegeben. Ein Test mit Angabe der zweizähligen Achse zwischen den beiden Monomeren ergab eine deutliche Verschlechterung der R-Faktoren um einige Prozentpunkte. Überraschend ist das Fehlen von alternativen Konformationen, die bei dieser Auflösung normalerweise anzutreffen sind. Erwähnenswert ist außerdem, dass auch in diesem Fall mit TLS-Parametern verfeinert wurde. Wie bereits in der nativen Struktur, wurden auch in der Struktur mit Calcium die einzelnen Domänen der beiden Untereinheiten als TLS-Gruppen definiert. Durch die Verwendung der insgesamt acht TLS-Gruppen sank der R-Faktor um 2,2 und der freie R-Faktor um 2,7 Prozentpunkte. Eine Verfeinerung mit anisotropen Temperaturfaktoren wurde auch versucht. Allerdings konnte nur in Kombination mit TLS-Parametern eine gewisse Verbesserung der R-Faktoren erreicht werden. Da diese Mehrfachbestimmung der thermischen Bewegung wenig Sinn ergibt und sich ohne TLS-Parameter die R-Faktoren etwas erhöhten, wurde auf anisotrope Temperaturfaktoren verzichtet⁷.

⁷Theoretisch sollte es keine Probleme geben, da das Verhältnis der gemessenen Reflexe im Verfeinerungssatz zur Anzahl der Atome in der Struktur bei über 17 liegt, während bei Verwendung anisotroper Temperaturfaktoren 10 Parameter pro Atom verfeinert werden müssen.

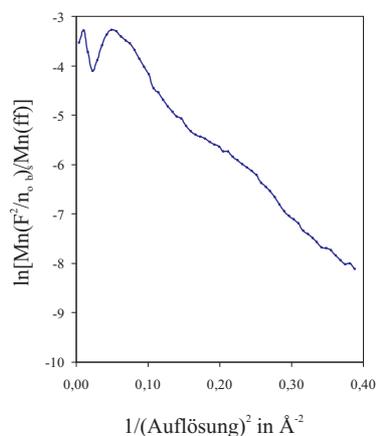


Abbildung 4.4: Wilson Plot des Datensatzes mit Calcium.

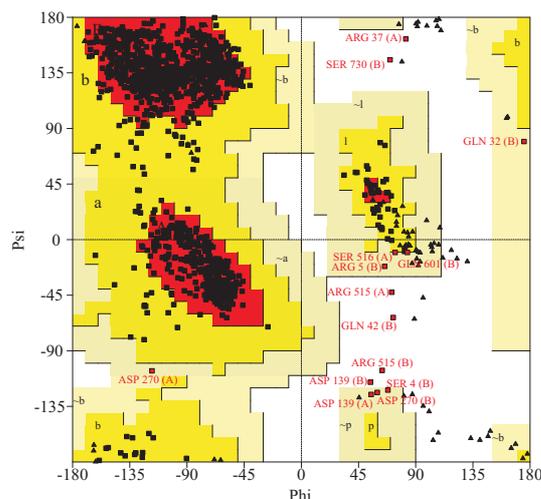


Abbildung 4.5: Ramachandran-Plot von der Faktor XIII-Struktur im Komplex mit Calcium.

Bis auf den schlecht definierten Bereich zwischen den Aminosäuren Pro36B und Leu41B konnten alle anderen Reste in die Elektronendichte eingebaut werden. Allerdings sind in den für Faktor XIII üblichen Bereichen um die Reste 40 und 520, sowie die N- und C-Termini nur schlecht definiert. Dies ist auch an den hohen Temperaturfaktoren der in diesen Abschnitten befindlichen Atome zu erkennen. Es wurde versucht, alle in der Sequenz enthaltenen Aminosäuren, d. h. auch Arg37B bis Asn40B, in die Struktur einzubauen. Aufgrund negativer Differenzdichte von weniger als -3σ auf der Hauptkette und den extrem hohen Temperaturfaktoren erschien es jedoch sinnvoller, den oben erwähnten Bereich wieder zu entfernen.

Der mit dem Program PROCHECK erstellte und in Abbildung 4.5 dargestellte Ramachandran-Plot weist 89,8% aller berücksichtigten Aminosäuren⁸ in dem am meisten bevorzugten Bereich und 9,1% im zusätzlich erlaubten Bereich aus. Damit liegen knapp 99% aller Aminosäuren in den erlaubten Regionen. Von den 8 im großzügig erlaubten Bereich befindlichen Aminosäuren liegen 4 (Asp139 und Asp270 der A-Kette, sowie Asp270 und Gln601 der B-Kette) in Schleifen und besitzen zumindest auf der Hauptkette eine gute Elektronendichte. Des Weiteren liegen Ser4B und Arg5B an dem nur mittelmäßig gut definierten N-terminalen Bereich. Die restlichen zwei Aminosäuren Ser516A und Gln32B befinden sich in den stets ungeordneten Bereichen zwischen Thr508A und Ser516A bzw. zwischen Glu30 und Leu45. Die 6 im verbotenen Bereich liegenden Aminosäuren (Arg37A, Arg515A, Gln42B, Asp139B, Arg515B und Ser730B) sind alle bis auf Asp139B, welches sich in einer gut definierten Schlaufe befindet, ungeordnet und somit in der Elektronendichte nur schlecht definiert. Dies erklärt dann auch die anomalen Torsionswinkel. Da insgesamt jedoch nur 1% aller betrachteten Aminosäuren nicht erlaubte Torsionswinkel aufweisen, kann man von einer sehr gut definierten Struktur sprechen.

Auf eine Übernahme der Konformation der schlecht definierten Aminosäuren aus besser definierten Bereichen in der nativen Struktur wurde bewusst verzichtet. Einerseits soll die verfeinerte Struktur sich nur aus den von diesem Kristall gemessenen Daten ergeben und nicht eine mittlere Struktur von verschiedenen Datensätzen repräsentieren. Andererseits können so gefundene Unterschiede besser verglichen und als unabhängige Strukturen angesehen werden. Und schließlich gibt es kei-

⁸Von der Berechnung ausgenommen sind alle Glycine und Proline, sowie die terminalen Aminosäuren.

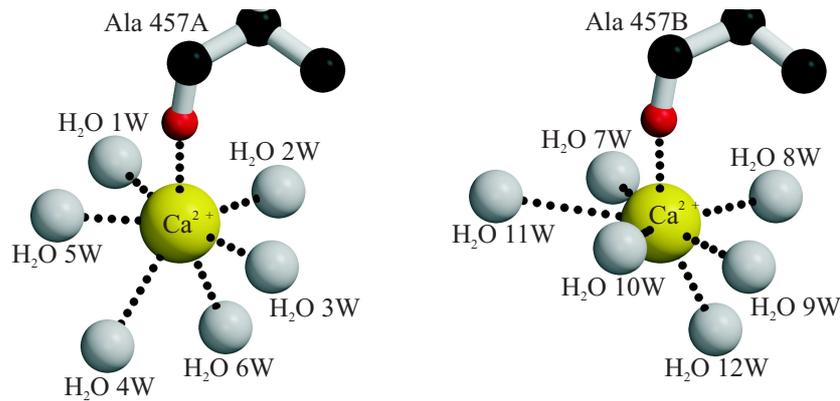


Abbildung 4.6: Die in der Struktur gefundenen Calciumionen (gelb) mit ihren Liganden. Die Beschriftung der Wassermoleküle (grau) entspricht der Nummerierung in der pdb-Datei.

ne signifikante negative Elektronendichte, die auf einen Fehler in der definierten Struktur hinweisen würde. Dieses Prinzip wurde auch auf die folgenden Strukturen angewandt.

Die hohe Auflösung der Daten erlaubt eine wesentlich detailliertere Beschreibung der Calcium-Bindung als es bisher möglich war, so dass alle Liganden des Calciumions in die Elektronendichte eingebaut werden konnten. In Abbildung 4.6 sind die beiden gebundenen Calciumionen samt Bindungspartner dargestellt. Interessanterweise ist die räumliche Anordnung der Liganden in den beiden Monomeren nicht identisch⁹. Im B-Monomer bilden fünf Wassermoleküle ein regelmäßiges Fünfeck, in dessen Zentrum sich das Calciumion befindet. Über dem Calcium befindet sich der Hauptkettensauerstoff von Ala457. Diese sechs Liganden bilden eine regelmäßige, pentagonale Pyramide. Der siebente Ligand jedoch, wieder ein Wassermolekül, ist seitlich versetzt unterhalb des Calcium zu finden. Damit bilden die sieben Liganden eine verzerrte, pentagonale Bipyramide. Diese Anordnung ist häufig zu finden und entspricht z. B. der Calciumbindung im Calmodulin. Im A-Monomer wiederum liegt ein Ligand aus dem zentralen Fünfeck ca. 1,5 Å unterhalb der in diesem Fall aus vier Wassermolekülen gebildeten Ebene. Die räumliche Anordnung der Liganden um das Calciumion im A-Monomer ähnelt der in der Literatur beschriebenen Form für die Bindung von Calcium in dem Calcium-bindenden Protein S100B [77]¹⁰.

Der Mittelwert der in Tabelle 4.5 aufgelisteten Sauerstoff-Calciumion-Abstände liegt bei 2,54 Å und liegt damit in der Nähe des in der Literatur angegebenen Wertes von 2,39 Å für diese Art Bindung [78]. Da es sich im hier vorliegenden Fall „nur“ um eine 1,6 Å-Struktur handelt, sind derartige Abweichungen normal.

Wie bereits in der Einleitung auf Seite 5 erwähnt, existiert von Faktor XIII eine häufig anzutreffende Variante, bei der das Valin an Position 34 durch ein Leucin ausgetauscht ist. Da bekannt ist, dass dieser Polymorphismus einen positiven Effekt auf die Aktivierung hat, wurde die Struktur von Thrombin im Komplex mit einem Teil des Aktivierungspeptids untersucht [79]. Ein Vergleich der Struktur dieses Peptids im Komplex mit Thrombin mit der Struktur des entsprechenden Abschnittes in der Faktor XIII-Struktur offenbart große Ähnlichkeiten. Zumindest die Aminosäuren Val34 bis Arg37 weisen in beiden Fällen eine fast identische Konformation auf. Dies ist etwas überraschend, da dieser Bereich sehr flexibel ist. Die „mittlere“ Struktur

⁹siehe dazu auch die Anmerkungen auf Seite 75

¹⁰Die Calcium-gebundene Form dieses Proteins hat den PDB-Code 1MHO.

Calciumion im A-Monomer		Calciumion im B-Monomer	
Ala457A O	2,33	Ala457B O	2,39
W1	2,40	W7	2,32
W2	2,31	W8	2,62
W3	2,38	W9	2,62
W4	2,80	W10	2,80
W5	2,32	W11	3,13
W6	2,52	W12	2,58

Tabelle 4.5: Abstände der Liganden vom Calciumion in Å.

dieser Schlaufe entspricht aber offensichtlich genau der von Thrombin bevorzugten Konformation.

4.1.3 Verwendung anomaler Daten zur exakten Quantifizierung der gebundenen Calciumionen

Der bisher gefundene Calcium-Bindungsort erscheint sowohl bei Beachtung der bereits publizierten biochemischen Untersuchungen, als auch unter Berücksichtigung der für die enzymatische Aktivität notwendigen strukturellen Änderung für nicht ausreichend. Dass Calciumionen sehr wohl auch ohne vorherige Spaltung des Aktivierungspeptids in der Lage sind, die Transformation von Faktor XIII in aktiven Faktor XIIIa zu initiieren, war bereits bekannt (siehe Abschnitt 1.3.2). Ob jedoch die Kristallpackung eine solche Aktivierung vollständig unterbinden kann, musste noch überprüft werden. Schon in Vorversuchen stellte sich heraus, dass die Kristalle ihre Streukraft nach längerer Inkubation in Calcium-haltiger Lösung verloren. Dieser Prozess verlief bei hohen Calcium-Konzentrationen schneller und war eine Ursache für die niedrige Auflösung der in [46] vorgestellten Faktor XIII-Struktur mit 200 mM CaCl_2 . Zur Bestätigung dieser Ergebnisse, wurde ein Kristall in eine wässrige Lösung bestehend aus 100 mM MES pH 6,3 und 200 mM CaCl_2 transferiert und in regelmäßigen Abständen Aufnahmen von diesem Kristall gemacht. Die in Abbildung 4.7 gezeigten Bilder dokumentieren ein langsames Auflösen des Kristalls als Reaktion auf das in der Lösung enthaltene Calcium. Weitere Versuch mit NaCl in der gleichen Konzentration (Abb. 4.8) bzw. der gleichen Ionenstärke (Abb. 4.9) zeigten eindeutig, dass es sich hierbei nicht um eine Reaktion auf die erhöhte Salzkonzentration handelt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weitere, nur schwach ausgeprägte Calcium-Bindungsstellen in der Faktor XIII-Struktur in Betracht gezogen. Nach erfolgter Abspaltung des Aktivierungspeptids durch Thrombin und der Bindung eines Calciumions an der beschriebenen Stelle, könnte es zu kleinen Konformationsänderungen oder auch nur zu Veränderungen in der Oberflächenladung kommen, welche als Konsequenz die Entstehung einer weiteren Bindungstasche für Calciumionen hat, bzw. die Affinität vorhandener Bindungstaschen für Calciumionen erhöhen. Dies würde die in älteren Publikationen geäußerten zahlreichen Vermutungen über mehr als nur ein gebundenes Calciumion pro Monomer erklären und gleichzeitig das Problem der Begründung der strukturellen Änderung zur Freilegung des aktiven Zentrums aufgrund des einen, gebundenen Calciumions lösen. Leider ist für die Bestätigung dieser Theorie die Struktur der aktiven Form notwendig, da das Zymogen offensichtlich nur eine Calciumionen-Bindungsstelle besitzt. Die aufgestellte Theorie geht aber von kleinen Strukturänderungen als Folge der Bindung des Calciumions an das Zymogen aus, in deren Folge sich weitere Calcium-Bindungsstellen bilden. Damit ist es sehr

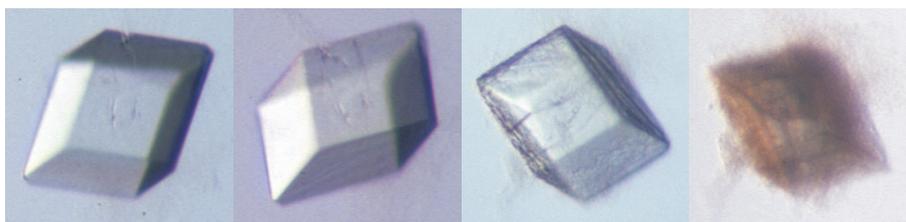


Abbildung 4.7: Aufnahmen eines monoklinen Faktor XIII-Kristalls in Puffer mit 200 mM CaCl_2 nach 0, 1, 4 bzw. 20 Stunden (v.l.n.r.).

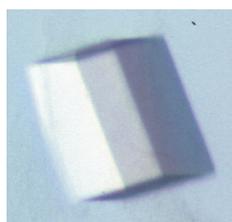


Abbildung 4.8: Aufnahmen eines monoklinen Faktor XIII-Kristalls in Puffer mit 200 mM NaCl nach einem Tag.

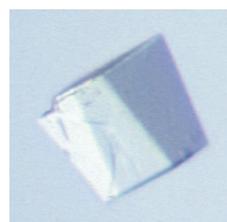


Abbildung 4.9: Aufnahmen eines monoklinen Faktor XIII-Kristalls in Puffer mit 600 mM NaCl nach einem Tag.

wahrscheinlich, dass die eine oder gar mehrere zusätzliche Calcium-Bindungsstellen schon in der Zymogenstruktur vorhanden sind, allerdings nur eine geringe Affinität aufweisen. Aufgrund der Tatsache, dass in der Röntgenkristallographie schwach gebundene, kleine Ionen leicht übersehen und fälschlicherweise als Wasser identifiziert werden, musste die Methode abgeändert werden. Zur Verdeutlichung dieses Problems soll an dieser Stelle nochmals darauf verwiesen werden, dass die aus den experimentellen Daten gewonnene Elektronendichtekarte vom Kristallographen interpretiert werden muss. Wie bei jeder Interpretation gibt es auch hier keine eindeutige, einzig richtige Lösung. Bei einer bestimmten Elektronendichte an einem Punkt der Karte kann man ein Wassermolekül einbauen oder dies für einen Messfehler halten oder aber ein Metallion mit nur wenigen Elektronen, wie z. B. Na^+ , an diese Stelle platzieren. Es ist ein offenes Geheimnis, dass in fast allen mit Röntgenkristallographie gelösten Strukturen keine Natriumionen vorkommen, obwohl fast immer Natriumionen in der Kristallisationslösung vorhanden sind und das Fehlen von Na^+ -Bindungsstellen in all diesen Strukturen sehr unwahrscheinlich ist. Da man aber leider nur die berechnete Elektronendichte sieht, können die leichten Metallionen wegen ihrer dem Wassermolekül ähnlichen Elektronenanzahl fast nicht von diesem unterschieden werden. Bei geschickter Wahl der verwendeten Wellenlänge der Röntgenstrahlen ist dies jedoch möglich.

Der so genannte anomale Effekt (siehe Abschnitt 3.12.2, Seite 23) ermöglicht innerhalb gewisser Grenzen genaue Aussagen, ob sich an einem bestimmten Ort ein Wassermolekül oder z. B. ein Calciumion befindet, da sich bei entsprechender Wellenlänge die anomalen Signale deutlich voneinander unterscheiden. Mit Hilfe dieser Technik sollten möglicherweise vorhandene, schwache Calciumionen-Bindungsstellen gefunden werden. In Abbildung 4.10 sind die anomalen Beiträge von Sauerstoff¹¹ und Calcium sowie weiterer in Faktor XIII enthaltenen Elemente abgebildet. Dass die anomalen Signale dieser Atome relativ schwach sind, verdeutlicht ein Vergleich

¹¹Da mit der Röntgenkristallographie die genaue Position so leichter Elemente wie Wasserstoff, der nur ein Elektron besitzt, in der Regel nicht bestimmt werden kann, reduziert sich in der Praxis das Wassermolekül auf ein Sauerstoffatom.

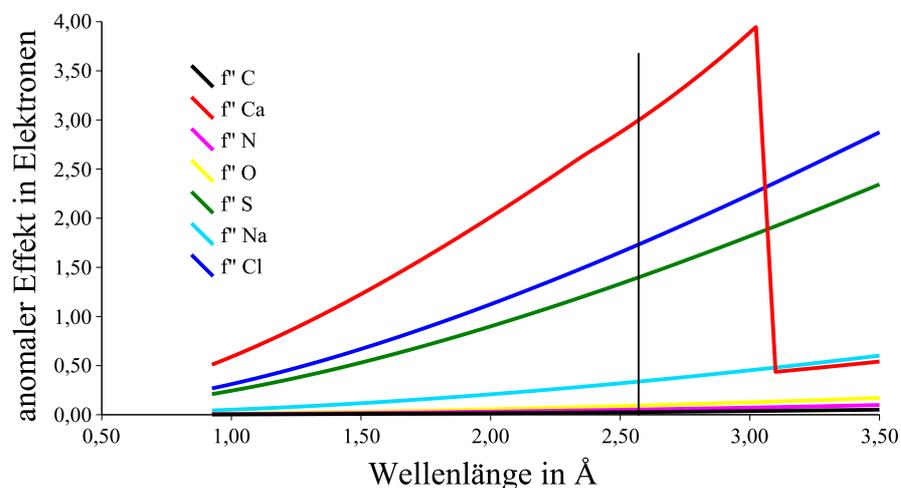


Abbildung 4.10: Vergleich der Wellenlängencharakteristika von Kohlenstoff (schwarz), Calcium (rot), Stickstoff (violett), Sauerstoff (gelb), Schwefel (grün), Natrium (hellblau) und Chlor (dunkelblau) nach [80].

mit dem in der Röntgenkristallographie gerne verwendeten Quecksilber, welches bei $0,8355 \text{ \AA}$ (L-I) ein f'' von rund 12 Elektronen besitzt¹². Wie aber eindeutig zu sehen ist, kann man bei der Verwendung einer Wellenlänge von 3 \AA ein Calciumion von einem Wassermolekül aufgrund der anomalen Signale unterscheiden. Zur Kontrolle der Methode kann man die in den Cysteinen und Methioninen enthaltenen Schwefelatome nutzen, da bei dieser Wellenlänge auch Schwefel einen ausreichend starken anomalen Effekt aufweist. Leider nimmt aber mit steigender Wellenlänge auch die Absorption der Röntgenstrahlen durch den in der Luft enthaltenen Stickstoff zu, was zu Problemen beim Auswerten der Daten führt. Zusätzlich ergeben sich größere Streuwinkel (siehe Seite 21), die die messbare Auflösung verringern. Deshalb werden in der Röntgenkristallographie Messungen bei langen Wellenlängen normalerweise nicht durchgeführt.

Ein in Calciumchloridlösung getränkter und mit Glycerin auf 100 K abgekühlter Faktor XIII-Kristall war aus den aufgeführten Gründen der erste Proteinkristall, der am Synchrotron in Triest bei einer langen Wellenlänge ($\lambda = 2,583 \text{ \AA}$) vermessen wurde. Es erfolgte zunächst eine Messung bei der größten am Monochromator einstellbaren Wellenlänge von 3 \AA . Aber starke Absorption und ein nicht perfekt arbeitender Monochromator¹³ zwangen zur Verwendung einer kürzeren Wellenlänge. Nach erfolgter Messung bei $\lambda = 2,583 \text{ \AA}$ wurde mit demselben Kristall ein weiterer Datensatz bei $\lambda/3 = 0,861 \text{ \AA}$ aufgenommen, welcher als Referenz beim Skalieren die-

¹²Bei einer Wellenlänge von $5,4 \text{ \AA}$ könnte zwar theoretisch ein Signal von 120 Elektronen gemessen werden, allerdings sind Experimente bei diesen Wellenlängen nur mit großem Aufwand möglich.

¹³Bei der Einstellung auf eine Wellenlänge von 3 \AA passierte den Monochromator ein Gemisch aus $\lambda = 3 \text{ \AA}$ und $\lambda/3 = 1 \text{ \AA}$, was zur Überlagerung von zwei verschiedenen Streubildern führte. Es stellte sich später heraus, dass durch leichtes Dejustieren eines Spiegels dieser Effekt auf Kosten der Strahlintensität unterdrückt werden konnte.

verwendete Wellenlänge in Å	2,583	0,861
Auflösungsgrenzen in Å	50–2,90 (3,00–2,90)	50–2,20 (2,28–2,20)
Anzahl der beobachteten Reflexe	137 876 (19 252)	334 022 (30 633)
davon einzigartig	38 101 (5 398)	90 214 (8 766)
Vollständigkeit	94,8 % (92,8 %)	98,3 % (97,9 %)
Redundanz	3,6 (3,6)	3,7 (3,5)
durchschnittliche Intensität	5 933 (1 189)	2 218 (199)
durchschnittliches Hintergrundrauschen	262 (90)	106 (81)
Signal-Rausch-Verhältnis	22,6 (13,2)	20,9 (2,4)
Temperaturfaktor (Wilson-Plot)	54,0 Å ²	42,2 Å ²
R _{merge}	5,8 % (10,6 %)	5,2 % (42,1 %)
R _{rim}	6,8 % (12,5 %)	6,1 % (49,4 %)
R _{pim}	3,5 % (6,5 %)	3,1 % (25,6 %)
R _{ano}	3,8 % (7,3 %)	3,4 % (32,9 %)

Tabelle 4.6: Anomaler und Referenz-Datensatz.

nen sollte. Aufgrund der hohen Absorption bei Messungen mit langen Wellenlängen und den daraus resultierenden Problemen beim Skalieren der Daten, wurden zur Auswertung der Daten verschiedene Programme getestet. Es waren dies DENZO, MOSFLM und XDS zum Indizieren sowie SCALA, XSCALE und SCALEPACK zum Skalieren. Zusätzlich wurde der Effekt eines Referenz-Datensatzes auf das Skalieren untersucht. Dabei erwies sich das Programm SCALA mit seinem besseren Skalierungs-Algorithmus als entscheidend bei der Auswertung der anomalen Daten¹⁴. Die wichtigsten Parameter der zwei Datensätze sind in Tabelle 4.6 aufgelistet, wobei für den anomalen Datensatz die Werte der DENZO/SCALA-Prozessierung mit Referenz angegeben wurden. Der Referenz-Datensatz hingegen wurde mit den Programmen DENZO und SCALEPACK prozessiert.

Wie in Weiss *et al.* [81] nachzulesen ist, zeigte eine Kombination von DENZO und SCALA bei Verwendung des Referenz-Datensatzes die geringsten Schwächen. Die damit berechnete Differenzkarte ist in Abb. 4.11 zu sehen. Zusammen mit einer schematischen Darstellung der Faktor XIII-Struktur sind dort die Positionen der 50 stärksten Signale in rot (bekannte Calciumionen), gelb (bekannte Schwefelatome) bzw. grün (nicht zuordenbar) dargestellt. Trotz der Lokalisierung der beiden am Dimer gebundenen Calciumionen, die natürlich die ersten beiden Positionen in der Liste der stärksten Signale in der anomalen Karte belegten, und fast aller Schwefelatome konnten keine weiteren Calciumionen in der Struktur gefunden werden. Für die Qualität der Messung spricht, dass von den 56 Schwefelatomen im Faktor XIII-Dimer 38 unter den 50 höchsten Signalen erschienen (mit Signalstärken zwischen $15,2\sigma$ und $4,5\sigma$) und weitere 14 Schwefel in der Liste bis 3σ zu finden sind. Es konnten nur die in stark beweglichen und damit schlecht definierten Bereichen befindlichen Schwefelatome der Methionine 512 und 731 der A- und B-Kette nicht lokalisiert werden.

In Anbetracht der Tatsache, dass Chlor bei der verwendeten Wellenlänge auch ein relativ starkes anomales Signal aufweist, siehe dazu Abb. 4.10, könnten einige der nicht den Schwefelatomen zugeordneten Signale Chloridionen sein. Allerdings ist dies nahezu auszuschließen. Diese Signale befinden sich alle an Positionen, die für eine Chlorid-Bindung nicht in Frage kommen, wie z. B. mehr als 4 Å vom nächsten Liganden entfernt.

¹⁴Da eine ausführliche Beschreibung dieser Arbeiten thematisch nicht unbedingt in diese Dissertation passt, sei an dieser Stelle auf [81] verwiesen.

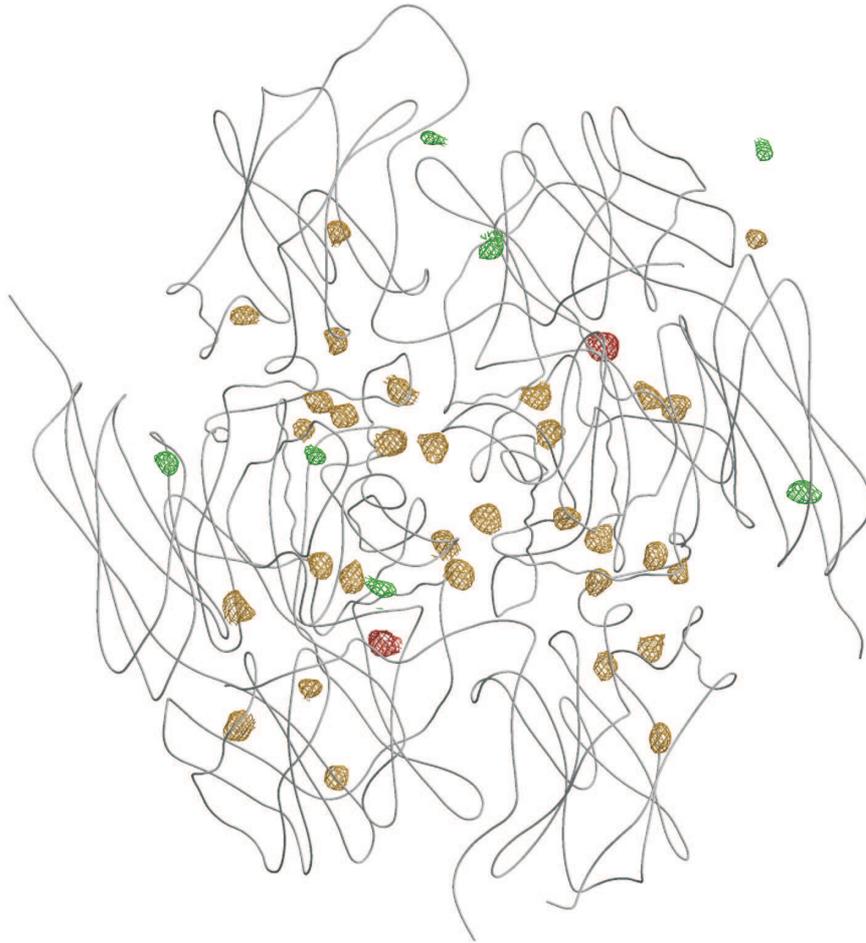


Abbildung 4.11: Anomale Differenzfourieraddition basierend auf den δF Werten. Es sind die 50 höchsten Signale ($15,2\sigma$ – $4,5\sigma$) dargestellt und die Karte auf einen Wert von 3σ skaliert. Die rot markierten Signale sind die Calciumionen, gelb die Schwefelatome und grün die Signale, die nicht zugeordnet werden konnten.

Symmetrie		$P2_1$
Einheitszelle (a, b, c, β)	137,27 Å, 69,22 Å, 183,21 Å, 107,27°	
Lösungsmittelgehalt		51,7 %
Auflösungsgrenzen in Å	25–2,27 (2,35–2,27)	
Anzahl der beobachteten Reflexe		429 995
davon einzigartig		150 837
Vollständigkeit	99,0 % (98,3 %)	
Redundanz		2,85
Signal-Rausch-Verhältnis		18,9 (5,5)
R_{merge}		4,0 % (20,7 %)
R_{rim}		4,8 % (25,8 %)
R_{pim}		2,8 % (15,1 %)

Tabelle 4.7: Daten aus Weiss *et al.* [82] entnommen.

4.1.4 FXIII-Struktur mit langer Zellachse

Bei der Suche nach geeigneten Bedingungen für das Abkühlen der Faktor XIII-Kristalle auf 100 K konnte bei der Verwendung hoher PEG 6000-Konzentrationen eine Veränderung der Einheitszelle beobachtet werden. Nach der bei ansteigender PEG 6000-Konzentration zu erwartenden Verkleinerung der Einheitszelle, ereignete sich bei ca. 36 % (w/v) PEG 6000 eine Umordnung der Proteinmoleküle, die im Ergebnis zu einem etwa doppelt so großen Volumen der Einheitszelle führte. Dieser Vorgang äußerte sich zunächst durch sichtbare Risse im Kristall, welche aber nach einiger Zeit wieder verschwanden. Durch Vermessung der Kristalle im Röntgenstrahl konnte bewiesen werden, dass es sich hierbei nur um kleine Änderungen im Inneren des Kristalls handelt. So ist das zweite in der asymmetrischen Einheit enthaltene Dimer um 5° gedreht, weshalb die Position nicht mehr über die Symmetrieeoperatoren (2_1 Schraubenachsen) beschrieben werden kann. Dies führt zum Verlust der Hälfte aller Schraubenachsen, und es ergibt sich eine neue, größere Einheitszelle. Dabei bildet die ursprüngliche (a+c)-Achse die neue a-Achse und die (-a+c)-Achse ergibt die neue c-Achse. Von einem solchen Kristall wurde von Dr. M.S. Weiss ein vollständiger Datensatz aufgenommen, dessen Parameter in Tabelle 4.7 aufgelistet sind, und die Struktur mit molekularen Ersatz gelöst.¹⁵

Da die gelöste Struktur der bereits bekannten Faktor XIII-Struktur sehr ähnlich war, wurde sie zunächst nicht weiter verfeinert. So wurde weder auf Seitenkettenkonformationen, noch auf die in der Elektronendichte vorhandenen Wassermoleküle näher eingegangen. Da sich aus den leichten Domänenbewegungen, die im Vergleich mit anderen FXIII-Strukturen untersucht werden sollten, Aussagen über mögliche Domänenbewegungen treffen lassen, erschien eine gründliche Verfeinerung der bei hohen PEG-Konzentrationen gewonnenen Struktur durchaus lohnenswert. Schließlich unterscheiden sich die Kristallkontakte in dieser Struktur deutlich von denen der bisher bekannten Strukturen. Somit wurde die vorhandene „Rohstruktur“ in mehreren Verfeinerungsrunden mit dem Programm REFMAC verfeinert. Dabei konnte auf die zuvor fertig gestellte 1,6 Å-Struktur zurückgegriffen werden. Des Weiteren wurde das Programm ARP zum Einbau von Wassermolekülen genutzt, wobei jede Position zusätzlich auch visuell kontrolliert und auf Richtigkeit überprüft wurde. Aus der abschließenden Struktur-Datei wurden die in Tabelle 4.8 aufgeführten Werte entnommen.

Im Laufe der Verfeinerung zeigte sich, dass sich die A- und die C-Kette sowie die B- und die D-Kette sehr stark ähneln. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene

¹⁵Näheres ist in [82] nachzulesen.

Anzahl der Aminosäuren	2 882
Anzahl der Wassermoleküle	1 262
rmsd Bindungen	0,019 Å
rmsd Winkel	1,688 °
durchschnittlicher B-Faktor	30,6 Å ²
R-Faktor	18,1 %
freier R-Faktor	23,1 %
Anzahl der Reflexe im Verfeinerungssatz	147 807
Anzahl der Reflexe im Testsatz	1 513

Tabelle 4.8: Struktur mit langer Achse.

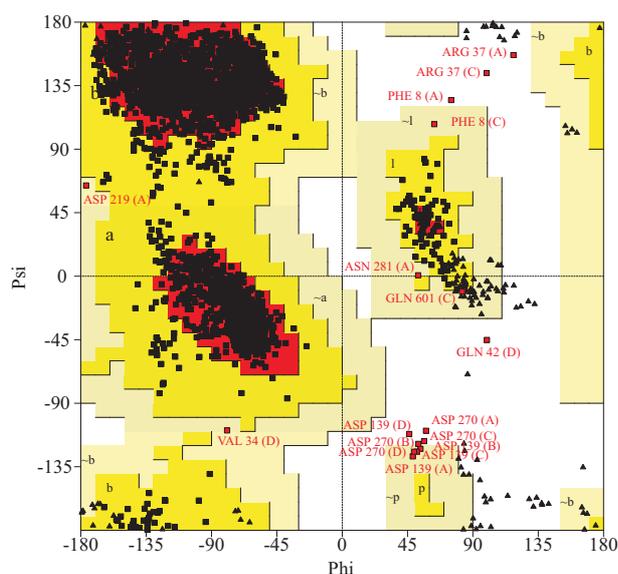


Abbildung 4.12: Ramachandran-Plot von der Faktor XIII Struktur mit langer Achse.

nichtkristallographische Symmetrien definiert, anstatt alle in einer zusammenzufassen. Die Ähnlichkeit ist um so mehr verwunderlich, als dass jeweils A- und B-, bzw. C- und D-Kette ein Dimer bilden. Offensichtlich ist der Einfluss der unterschiedlichen Kristallkontakte größer als der des Partnermonomers. Trotz der nicht sehr hohen Auflösung kam auch in diesem Fall eine TLS-Verfeinerung zum Einsatz. Allerdings war der Effekt in diesem Fall nicht so groß wie bei der 1,6 Å-Struktur — die R-Faktoren verringerten sich jeweils um etwa einen Prozentpunkt.

In der Struktur fehlen einige sehr bewegliche Bereiche, da hier ein Einbau von Aminosäuren keine befriedigenden Resultate brachte. Es sind dies die Reste 509–515 in der A-Kette, 34–40 und 509–515 in der B-Kette, 508–515 in der C-Kette, sowie die Aminosäuren 36–40 und 509–516 in der D-Kette. Damit fehlen insgesamt 42 der 2924 in der asymmetrischen Einheit befindlichen Aminosäuren. Auch hier fällt wieder die Ungleichheit der je ein Dimer bildenden Ketten auf. Während im A- und C-Monomer die Schlaufe mit der flexiblen Thrombin-Schnittstelle in der Elektronendichte gerade noch erkennbar ist, fehlt dieser Abschnitt in den anderen beiden Ketten.

Ein Blick auf den Ramachandran-Plot (siehe Abb. 4.12) zeigt, dass sich nur wenige Aminosäuren außerhalb der erlaubten Gebiete befinden. Von den 2 882 in der Struktur definierten Resten liegen ganze 17 in diesen Bereichen. Darunter auch

die „üblichen Verdächtigen“ Asp139 und Asp270, welche in allen Faktor XIII-Strukturen Probleme bereiten: Die am schlecht definierten N-Terminus liegenden Phe8A und Phe8C sowie die Aminosäuren in dem sehr beweglichen Bereich der Thrombin-Schnittstelle Arg37A, Arg37C, Val34D und Gln42D. Die restlichen Aminosäuren mit ungewöhnlichen Hauptkettentorsionswinkeln (Asp219A, Asn281A und Gln601C) liegen alle in Schleifen bzw. Kehren und sind in der Elektronendichte gut definiert.

4.1.5 Kristallisation in der Schwerelosigkeit

Zur Untersuchung des Einflusses der Gravitation auf die Kristallisation von Proteinen, wurde ein von der Europäischen Union unterstütztes Projekt mit dem Namen „Andromeda“ von einem Team aus Granada, Spanien, initiiert. Für diesen Zweck wurden bereits kristallisierte Proteine, darunter Faktor XIII, ausgewählt, die mit der Gel-Akupunktur-Methode (siehe Abschnitt 3.13.2) sowohl auf der Erde (Kontrollexperiment) als auch im Weltraum kristallisiert werden sollten. Dafür wurden parallel zwei Experimente mit je zwei verschiedenen Faktor XIII-Konzentrationen (2,15 und 4,3 mg/ml) und je zwei verschiedenen Kapillargrößen (0,3 und 0,4 mm Durchmesser) angesetzt. Ein Experiment blieb auf der Erde, während der zweite Ansatz mit einer Sojus-Kapsel für 4 Wochen in das Weltall befördert wurde. Aufgrund der speziellen Kristallisationstechnik, konnte eine Beeinflussung der Kristallisation durch die schweren Erschütterungen beim Transport in den Weltraum verhindert werden. Dafür wurden die Kapillaren nach dem Beladen mit Proteinlösung so tief in das Fällungsmittel und Proteinlösung trennende Agarosegel geschoben, dass die beiden Komponenten erst 24 Stunden nach dem Start — und damit auch nach den Erschütterungen — zusammentreffen würden. Nach der Landung und dem Versand der beiden Experimente zurück nach Jena wurden die Kristalle in Bezug auf visuelle Kristallqualität, Empfindlichkeit gegenüber Röntgenstrahlen und Qualität der gemessenen Streudaten verglichen. Unter visueller Kristallqualität sollen hierbei Größe, Aussehen und Form verstanden werden. Zusätzlich wurden alle aus der Datenprozessierung gewonnenen Parameter wie Auflösungslimit, Mosaizität, Signal-zu-Rausch-Verhältnis, R-Faktoren und Temperaturfaktor sowie die kontinuierliche Abnahme der Streukraft aufgrund von Strahlungsschäden zur Bewertung hinzugezogen. Da für einen fairen Vergleich zwischen Schwerelosigkeit und Kontrollexperiment auf der Erde möglichst viele Kristalle vermessen werden mussten, wurden alle in den Kapillaren gewachsenen Kristalle von mind. 50 μm Größe montiert und bei einem Auflösungslimit von mind. 3 \AA die Daten bei Raumtemperatur mit 1° pro Bild und 30 min pro Aufnahme bis zum Absinken des Auflösungslimits unter 4 \AA vermessen, was in der Regel nach 50° der Fall war. Damit standen für einen Vergleich schließlich Daten von 5 in Schwerelosigkeit gewachsenen Kristallen und von 8 Kristallen des Kontrollperiments zur Verfügung. Trotz der Tatsache, dass wegen der Vermessung der Kristalle bei Raumtemperatur niemals ein kompletter Datensatz gesammelt werden konnte, wurde bewusst auf eine Abkühlung der Kristalle auf 100 K verzichtet, da eine Beeinflussung der Messergebnisse durch das Abkühlen vermieden werden sollte. Der gleiche Grund führte zum Belassen der Kristalle in den Kapillaren, in denen sie gewachsen waren. Falls nötig, wurde durch Einblasen von Luft mit Hilfe einer kleinen Kapillare die Proteinlösung vom Kristall separiert, um eine Bewegung während der Messung zu unterbinden. Die gesammelten Daten wurden mit DENZO prozessiert, mit SCALEPACK die Einheitszelle verfeinert, mit SCALA die Daten skaliert und schließlich mit TRUNCATE und RMERGE analysiert.

Fast alle Kristalle sahen perfekt aus, es gab nur selten Verwachsungen. Allerdings konnte man einen deutlichen Einfluss der verwendeten Proteinkonzentration feststellen. Bei der Verwendung von 4,3 mg/ml Faktor XIII wuchsen eindeutig größere

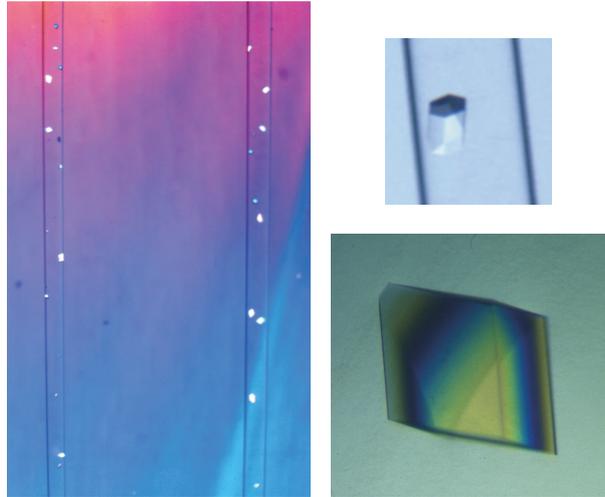


Abbildung 4.13: Auf dem linken Bild sind zwei Kapillaren mit Kristallen zu sehen, welche in der Schwerelosigkeit gewachsen sind. Unter polarisiertem Licht sind die vielen, gut aussehenden Kristalle deutlich zu erkennen. Ein einzelner Kristall ist vergrößert rechts oben zu sehen. Deutlich ist die hexagonal-prismatische Form erkennbar, die bei fast allen in den Kapillaren gewachsenen Kristallen zu finden ist. Darunter ist zum Vergleich der Form und Größe ein typischer Kristall aus einem hängenden Tropfen dargestellt.

	normale Gravitation	Schwerelosigkeit
Einheitszelle (a, b, c in Å, β in $^\circ$)	101,08, 72,66, 134,74 106,05	101,01, 72,62, 134,58 106,10
Mosaizität	0,34 $^\circ$	0,35 $^\circ$
R_{merge}	9,4 %	11,2 %
R_{rim}	13,1 %	15,6 %
R_{pim}	9,0 %	10,8 %
Signal/Rauschen	5,21	4,93
Temperaturfaktor	50,78 \AA^2	54,30 \AA^2

Tabelle 4.9: Durchschnittswerte der verschiedenen Datensätze.

Kristalle, wobei die großen Exemplare ca. $100 \mu\text{m}$ in allen Dimensionen erreichten. Der größte Kristall erreichte gar $200 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ und befand sich in der $0,4 \text{ mm}$ Kapillare mit $4,3 \text{ mg/ml}$ Faktor XIII des Kontrolllexperiments. Der Kapillardurchmesser schien keinen Einfluss auf die Kristallgröße zu haben, da es einmal in der $0,3 \text{ mm}$ Kapillare (Kontrolle) und einmal in der $0,4 \text{ mm}$ Kapillare (Weltraum) etwas größere Kristalle gab. Im Vergleich zur Kristallisation im hängenden Tropfen, wo die großen Kristalle normalerweise $300 \mu\text{m}$ erreichen und sogar schon $700 \mu\text{m}$ erreichten [46], waren die hier gefundenen Kristalle jedoch relativ klein. Anzumerken ist, dass in allen Kapillaren fast ausschließlich hexagonal-prismatische Kristalle entstanden, während unter identischen Bedingungen im hängenden Tropfen normalerweise FXIII-Kristalle in Form eines schiefen Parallelepipedes wachsen.

Da es visuell keine eindeutigen Unterschiede zwischen den in Schwerelosigkeit gewachsenen Kristallen und der Kontrolle gab, war der Vergleich der Streudaten von großer Bedeutung. Hierzu muss man jedoch anmerken, dass die aufgelisteten R-Faktoren und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis sehr eng an die Kristallgröße gekoppelt sind und daher nur bedingt aussagekräftig sind. Trotzdem scheint es gewisse

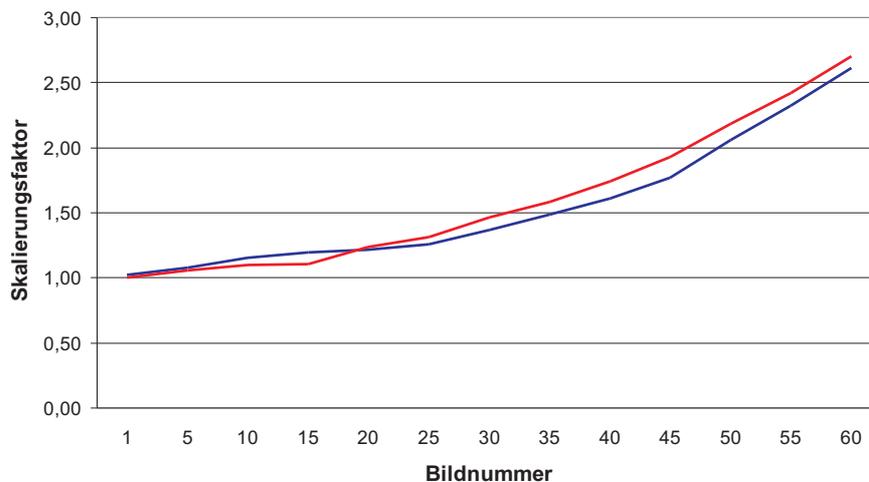


Abbildung 4.14: Vergleich der Skalierungsfaktoränderung im Laufe der Messung von bei Schwerelosigkeit gewachsenen Kristallen (blau) und der Kontrolle (rot).

Unterschiede zu geben. So sind die in der Schwerelosigkeit gewachsenen Kristalle stets etwas schlechter, was R-Faktoren, Signal-zu-Rausch-Verhältnis und Temperaturfaktor betrifft. Die Größe und Symmetrie der Einheitszelle werden allerdings nicht beeinflusst.

Wie erwartet waren die Kristalle sehr empfindlich gegenüber Röntgenstrahlen. Zur grafischen Darstellung ist in Abb. 4.14 der im Laufe der Messung zu beobachtende Anstieg des Skalierungsfaktors aus SCALA dargestellt. Mit diesem Faktor werden alle gemessenen Reflexintensitäten eines Bildes multipliziert. Er dient u. a. dem Ausgleich des Intensitätsverlustes durch Strahlenschäden, der Angleichung von Daten von verschiedenen Kristallen und unterschiedlich starker Belichtung von verschiedenen Aufnahmen eines Kristalls. Da nur ein Kristall und eine konstante Belichtungszeit bei einem gleichbleibend starken Röntgenstrahl zum Einsatz kamen, spiegelt sich hier hauptsächlich der Streuverlust durch Strahlungsschäden wieder. Je höher der Skalierungsfaktor, desto größer der Verlust an Streukraft. Leider ergibt sich auch hier kaum ein Unterschied zwischen den zwei Gruppen von Kristallen, da die etwas flacher verlaufende Kurve für die Kristalle aus der Schwerelosigkeit nicht wesentlich besser ist als die der Kontrollgruppe.

4.2 Kristallisation in der orthorhombischen Kristallform

Wie bereits erwähnt, existierten bereits zu Beginn dieser Arbeit zwei verschiedene Kristallisationsbedingungen für die orthorhombischen FXIII-Kristalle und auch eine Struktur mittlerer Auflösung¹⁶. Zunächst wurde eine Reproduktion der Kristalle nach [42] versucht. Dabei wurden pH-Wert, Pufferkonzentration (MES) und Fällungsmittelkonzentration variiert. Die besten Kristalle konnten schließlich bei 20 mM MES pH 5,6 und 18 % Ammoniumsulfat gefunden werden. Diese quaderförmigen Kristalle erreichten eine Größe von bis zu 250 μm x 250 μm x 300 μm . Auffallend

¹⁶Zur Strukturbestimmung der ersten FXIII-Struktur mit dem pdb-Code 1GGT in der PDB-Datenbank bei 2,65 Å wurden orthorhombische Kristalle verwendet.

Symmetrie		P2 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszelle (a, b, c)	98,62 Å, 179,94 Å, 93,86 Å	
Lösungsmittelgehalt		52,4 %
Temperaturfaktor aus dem Wilson-Plot		53,3 Å ²
Auflösungsgrenzen in Å	∞–2,40 (2,44–2,40)	
Anzahl der beobachteten Reflexe (2,46 Å–2,40 Å)	1 102 187 (81 820)	
davon einzigartig (2,46 Å–2,40 Å)	65 992 (4 831)	
Vollständigkeit (2,46 Å–2,40 Å)	99,9 % (99,9 %)	
Redundanz (2,46 Å–2,40 Å)	16,7 (16,9)	
durchschnittliche Intensität	1 062 (79)	
durchschnittliches Hintergrundrauschen	24 (19)	
Signal-Rausch-Verhältnis	44,7 (4,1)	
R _{merge}	8,3 % (88,8 %)	
R _{rim}	8,5 % (91,6 %)	
R _{pim}	10,5 % (22,1 %)	

Tabelle 4.10: Parameter des nativen Datensatzes (orthorhombische Kristallform).

war, dass die bereits beschriebene Abtrennung des Niederschlags (siehe Seite 32) zu deutlich besseren Resultaten in Form von weniger und größeren Kristallen führte.

Zum Vergleich wurden parallel dazu orthorhombische FXIII-Kristalle bei 10,5 % (w/v) Ammoniumacetat pH 7,4 gezüchtet. Form und Größe dieser Kristalle entsprachen der oben genannten Bedingung, allerdings waren mit Ammoniumacetat als Fällungsmittel häufiger Kristalle in den Tropfen zu finden, was zu einer Bevorzugung dieser Kristallisationsbedingung führte.

4.2.1 Die native FXIII-Struktur

Die nativen Kristalle wuchsen bei 20 °C unter Verwendung von 10,5 % Ammoniumacetat pH 7,4 im Reservoir und 4,3 mg/ml Faktor XIII, wobei Proteinlösung und Reservoir im Verhältnis 1:2 gemischt wurden. Zur Vermessung bei 100 K wurden die Kristalle in eine 10,5 % Ammoniumacetat pH 7,4 und 15 % Glycerin enthaltende Lösung überführt. Darin verblieben sie für ca. 90 min und wurden anschließend direkt im Kryostrahl abgekühlt. Der hier aufgeführte Datensatz (siehe Tabelle 4.10) wurde am DESY Hamburg (Beamline X13) gesammelt. Wie erwartet, war das erreichbare Auflösungslimit nicht so hoch wie bei den monoklinen Kristallen. Trotz langer Belichtungszeiten konnten brauchbare Daten nur bis 2,4 Å gesammelt werden. Eine mögliche Ursache dafür ist der relativ zu den Datensätzen der monoklinen Kristalle fast doppelt so hohe Temperaturfaktor aus dem Wilson-Plot, der die sehr schnelle Abnahme der Reflexintensitäten beschreibt.

Zwar sind einzelne Reflexe noch bis 2 Å sichtbar, aber die schlechte Qualität der Reflexe in dieser Region erlaubte es nur, die Daten bis 2,4 Å zu nutzen. Selbst bei dieser Auflösung sind die R-Faktoren in der höchsten Auflösung noch sehr schlecht. Da aber das Signal um den Faktor 4 über dem Rauschen liegt, der Wilson-Plot keine Anomalien aufweist (siehe Abb. 4.15) und die Redundanz sehr hoch ist, wurden die Daten bis zu dieser Auflösung genutzt. Ein Vergleich der Verfeinerungsergebnisse bei niedrigeren Auflösungsgrenzen als der hier erwähnten 2,4 Å, wird weiter unten im Text beschrieben.

Da es sich hierbei um eine andere Raumgruppe handelte, konnte das bisherige FXIII-Modell nicht direkt als Vorlage zur Phasenbestimmung genutzt werden. In diesem Fall war die Methode des molekularen Ersatzes die beste und einfachste Methode. Das dafür verwendete Programm AMORE fand bei Verwendung des Mo-

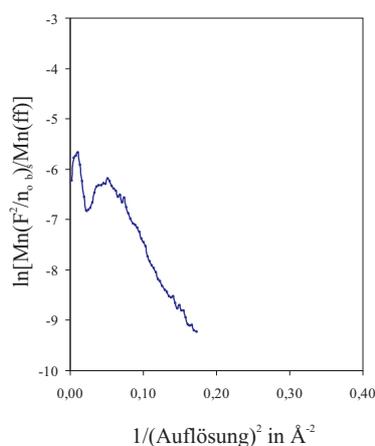


Abbildung 4.15: Wilson-Plot des Datensatzes.

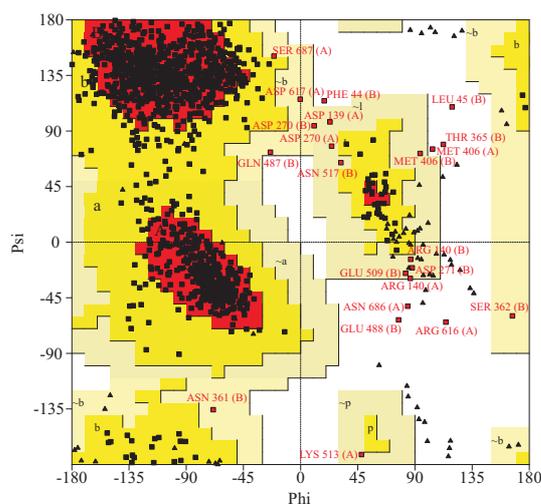


Abbildung 4.16: Ramachandran-Plot von der orthorhombischen Faktor XIII Struktur.

Anzahl der Aminosäuren	1 422
Anzahl der Wassermoleküle	353
rmsd Bindungen	0,016 Å
rmsd Winkel	1,646 °
durchschnittlicher B-Faktor	30,6 Å ²
R-Faktor	22,5 %
freier R-Faktor	28,7 %
Anzahl der Reflexe im Verfeinerungssatz	59 069
Anzahl der Reflexe im Testsatz	3 332

Tabelle 4.11: Parameter der verfeinerten Struktur.

nomers auch ohne Probleme eine geeignete Lösung, deren R-Faktor bei rund 34 % lag.

Aufgrund der nur mittleren Auflösung der Daten war die Verwendung von nicht-kristallographischer Symmetrie nicht nur sinnvoll, sondern zur guten Strukturbestimmung zwingend notwendig. Die Verwendung von TLS-Parametern ist jedoch bei Strukturen dieser Auflösung selten anzutreffen. Da es aber zu einer deutlichen Verbesserung des freien R-Faktors bei Anwendung der bereits bei den hochauflösten Strukturen erfolgreich verwendeten TLS-Gruppen-Definitionen kam und die Verfeinerung stabil blieb, wurde auch in diesem Fall mit TLS-Parametern gearbeitet. Rückblickend kann man sagen, dass die Verwendung von TLS-Parametern einen freien R-Faktor unter 30 % überhaupt erst möglich machte.

Die relativ hohen R-Faktoren zeigen sich auch in dem Ramachandran-Plot (siehe Abb. 4.16). Eine einfache Regel besagt, dass bei guten Strukturen etwa 90 % aller Aminosäuren in den am meisten bevorzugten Gebieten liegen sollten — in diesem Fall sind es nur 83 %. Allerdings befinden sich auch nur 1,8 % (dies entspricht 22 Aminosäuren) außerhalb der erlaubten Bereiche. Fast alle dieser auffälligen Aminosäuren befinden sich in schlecht definierten, beweglichen Bereichen oder in Kehren (turns). Die übrigen Reste, wie z. B. Thr365B, sind in der Elektronendichte gut definiert, so dass keine Ursachen für die ungewöhnlichen Torsionswinkel zu erkennen sind.

Für eine 2,4 Å-Struktur sind die R-Faktoren etwas hoch. Da die verwendeten

Symmetrie		P2 ₁ 2 ₁ 2
Einheitszelle (a, b, c)	98,44 Å, 179,84 Å, 93,97 Å	
Lösungsmittelgehalt		52,5 %
Temperaturfaktor aus dem Wilson-Plot		66,8 Å ²
Auflösungsgrenzen in Å	∞–2,70 (2,75–2,70)	
Anzahl der beobachteten Reflexe	803 809 (59 048)	
davon einzigartig	46 630 (3 421)	
Vollständigkeit	100,0 % (100,0 %)	
Redundanz	17,2 (17,3)	
durchschnittliche Intensität	1077 (99)	
durchschnittliches Hintergrundrauschen	24 (20)	
Signal-Rausch-Verhältnis	44,6 (5,0)	
R _{merge}	8,9 % (82,7 %)	
R _{rim}	9,2 % (85,1 %)	
R _{pim}	2,2 % (20,1 %)	

Tabelle 4.12: Datensatz eines orthorhombischen FXIII-Kristalls mit Calcium.

Daten in den hohen Auflösungsbereichen sehr hohe R_{merge}-Werte aufwiesen¹⁷, wurden nach Abschluss der Strukturverfeinerung einige Verfeinerungen mit niedrigeren Auflösungsgrenzen berechnet. Sollten die schlechten Daten von der hohen Auflösung für die relativ hohen R-Faktoren verantwortlich sein, müsste sich dies in deutlich besseren Qualitätsindikatoren bemerkbar machen. Es ergaben sich aber nur geringfügige Verbesserungen der R-Faktoren. So verringerte sich der freie R-Faktor bei einem Auflösungslimit von 2,5 Å von 28,7 % auf 28,4 % und bei 2,6 Å auf 27,8 %. Des Weiteren gab es weder in der berechneten Elektronendichte, noch im Ramchandran-Plot signifikante Verbesserungen, die eine Änderung der Auflösungsgrenze rechtfertigen würden.

4.2.2 Der Komplex mit Calcium

Für einen umfassenden Vergleich der FXIII-Strukturen unter verschiedenen Kristallisationsbedingungen war auch eine Struktur in der orthorhombischen Kristallform mit Calcium notwendig. Auch wenn zwischen den monoklinen Kristallen mit bzw. ohne Calcium keine deutlichen Unterschiede in der FXIII-Struktur gefunden werden konnten, besteht die Möglichkeit, dass sich aufgrund der in diesem Fall abweichenden Kristallpackung Differenzen beobachten lassen.

Zu diesem Zweck wurde ein 200 μm x 200 μm x 200 μm großer FXIII-Kristall, der unter den auf Seite 49 beschriebenen Bedingungen wuchs, in eine 100 mM CaCl₂ und 10,5 % Ammoniumacetat pH 7,4 enthaltende Pufferlösung transferiert. Nach ca. 19 Stunden wurde dieser Kristall für eine Stunde in eine zusätzlich 30 % Glycerin enthaltende Lösung überführt und anschließend auf 100 K abgekühlt. Die Vermessung erfolgte am DESY Hamburg (Beamline X13).

Wie bereits bei dem vorangegangenen Datensatz eines orthorhombischen Kristalls gab es auch in diesem Fall Probleme mit der Qualität der Daten, so dass dies der Faktor XIII-Datensatz mit der niedrigsten Auflösung ist. Die in Tabelle 4.12 aufgelisteten Werte zeigen zunächst eindeutig, dass es auch hier zu keiner signifikanten Änderung der Einheitszelle in Folge der Calciumzugabe bzw. der erhöhten Glycerinkonzentration kommt. Die Calcium enthaltende Einheitszelle ist nur um

¹⁷An dieser Stelle sei aber auf Tabelle 4.1 auf Seite 33 verwiesen. Die dort aufgeführten R-Faktoren der nativen Struktur in der monoklinen Kristallform sind in der hohen Auflösung ähnlich hoch. Trotzdem ergaben diese Daten eine Struktur mit niedrigen R-Faktoren.

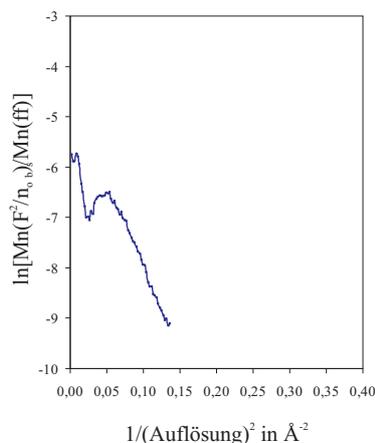


Abbildung 4.17: Wilson-Plot der Daten mit Calcium.

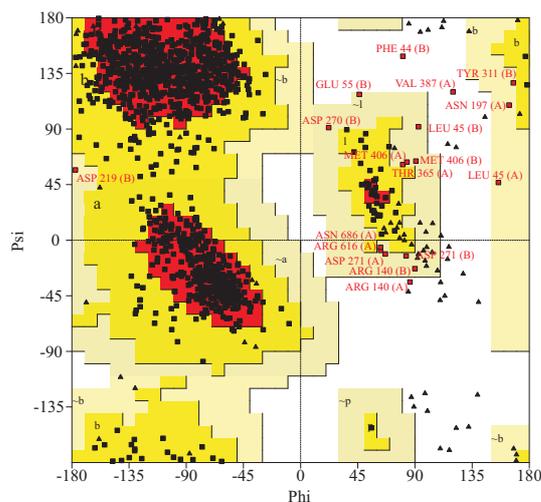


Abbildung 4.18: Ramachandran-Plot von der orthorhombischen Faktor XIII Struktur mit Calcium.

0,1 % größer. Dies ist ein Unterschied, der auch zwischen zwei gleichartigen FXIII-Kristallen bestehen könnte. Außerdem sind der sehr hohe Temperaturfaktor von 67 \AA^2 und die wiederholt hohen R_{merge} -Werte in der hohen Auflösung bemerkenswert.

Wie bei dieser Auflösung nicht anders zu erwarten, war bei der Strukturverfeinerung die Verwendung von nicht-kristallographischer Symmetrie für gute R-Faktoren zwingend notwendig. Eine Verwendung von TLS-Parametern war zunächst nicht geplant gewesen. Da aber im Falle der nativen Struktur die TLS-Parameter große Verbesserungen in der Struktur brachten und alle bisher beschriebenen Strukturen auch mit TLS-Parametern verfeinert wurden, sollte auch in diesem Fall nicht darauf verzichtet werden. Die ersten Ergebnisse mit TLS-Parametern zeigten schließlich, dass diese Entscheidung richtig war. So sank der R-Faktor um 1,7 % und der freie R-Faktor sogar um 3,2 %. Allerdings waren bei der Verfeinerung leichte Instabilitäten zu beobachten. So kam es in etwa einer von 10 Verfeinerungsrunden zu einem sprunghaften Anstieg der R-Faktoren um 0,1 Prozentpunkte¹⁸. Da dies keine starke Schwankung darstellt und die R-Faktoren durch den Einsatz von TLS-Parametern deutlich verkleinert werden konnten, wurden die beschriebenen Instabilitäten toleriert.

Der Ramachandran-Plot (siehe Abb. 4.18) weist 15 Aminosäuren (1,2 %) in großzügig erlaubten Bereichen und 3 Aminosäuren (0,2 %) in verbotenen Bereichen aus. In Anbetracht der nur mittleren Auflösung der Struktur und der unter den auffälligen Resten zahlreichen bekannten Problemerkandidaten, ist das ein ganz ordentliches Ergebnis.

Auch die Calcium-Bindung ist entsprechend Auflösung nur mittelmäßig gut in der Elektronendichte definiert. Zwar sind die beiden Calciumionen eindeutig zu erkennen, aber es konnte nicht ein Wasser-Ligand in die Struktur eingebaut werden. Da diese Struktur jedoch von Anfang an nur für den Vergleich mit den restlichen Strukturen in Bezug auf Domänenbewegungen benötigt wurde, ist die fehlende Auflösung bekannter Feinheiten der Faktor XIII-Struktur kein großer Verlust.

¹⁸Eine solche Steigerung scheint nicht viel zu sein, da sich aber die R-Faktoren in dieser Phase der Verfeinerung in der Regel schrittweise um wenige Hundertstel verringern, kann man eine Erhöhung um ein Zehntel durchaus als sprunghaft bezeichnen.

Anzahl der Aminosäuren	1 418
Anzahl der Wassermoleküle	115
Anzahl der Calciumionen	2
rmsd Bindungen	0,016 Å
rmsd Winkel	1,731 °
durchschnittlicher B-Faktor	35,0 Å ²
R-Faktor	22,3 %
freier R-Faktor	28,2 %
Anzahl der Reflexe im Verfeinerungssatz	41 872
Anzahl der Reflexe im Testsatz	2 354

Tabelle 4.13: FXIIIo-Struktur mit Calcium.

```

R65L Tridegin KLLPCKEWHQ GIPNRCWCG ADLECAQDQY CAFIPQCRPR SELIKPMDDI
org. Tridegin KLLPCKEXHQ GIPNRCXCG ADLEXAQDQY CAFIPQXRPR SELIKPMDDI

R65L Tridegin YQRPVEFPNL PLKPLEESLE HHHHHH
org. Tridegin YQRPVXFPNL PLKPRX

```

Abbildung 4.19: Aminosäuresequenzvergleich des in [83] publizierten und des verwendeten Tridegins.

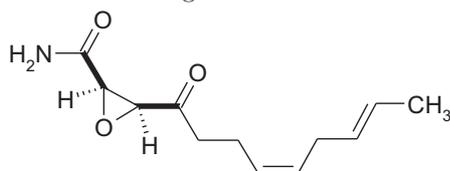


Abbildung 4.20: Cerulenin (2,3-epoxy-4-oxo-7,10-Dodecadienamid).

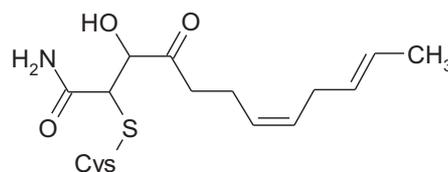


Abbildung 4.21: Ein an Cystein gebundenes Cerulenin.

4.3 Versuch der Kristallisation von aktiviertem Faktor XIII

Die Struktur eines Enzyms ist oft erst dann von Interesse, wenn sie Informationen zur Substratbindung und zum Reaktionsmechanismus liefern kann. Leider kann zu genau diesen Punkten mit Hilfe der Zymogenstruktur des Faktor XIII wenig ausgesagt werden. Aus diesem Grund war die Aufklärung der Struktur des aktivierten Faktor XIII (FXIIIa), am besten mit gebundenem Substrat, eines der Hauptziele dieser Arbeit. Für die Kristallisation aber muss der Komplex aus Enzym und Substrat stabil sein. Um dieses Ziel zu erreichen, gab es zwei Möglichkeiten: Das Arbeiten mit inaktiven Mutanten oder das Verwenden von Inhibitoren. Zunächst sollten mit inaktive Varianten von Faktor XIII experimentiert werden, die noch ein Substrat binden konnten. Natürlich stellte hierbei die katalytische Triade den entscheidenden Angriffspunkt dar. So ist bekannt, dass bei einem Austausch des Cysteins oder des Histidins gegen Alanin keine Aktivität mehr messbar ist [84]. Da in diesem Zusammenhang jedoch noch nichts über eine erfolgreiche Substratbindung ausgesagt wird, wurde für die Kristallisation die H373A-Mutante ausgewählt. Die Idee dahinter war, dass bei dieser Mutante eine erfolgreiche Bindung des Substrats wahrscheinlicher ist, als bei der C314A-Mutante, bei der das als direkter Bindungspartner fungierende Cystein fehlen würde. Leider erwies sich die Expression und Aufreinigung des Materials als sehr schwierig. Aus 10l *E. coli*-Kultur konnten nur ca. 40 µg der H373A-Mutante in einer Konzentration von 0,04 mg/ml gereinigt

werden¹⁹. Eine Aufkonzentration wurde versucht, war aber mit solchen Verlusten verbunden, dass die anschließende Konzentrationsbestimmung zu keinem brauchbaren Ergebnis führte. Da auch eine Optimierung der Aufreinigungsprozedur nicht die erhoffte Wirkung zeigte, wurden die Arbeiten hierzu nach mehreren Monaten und zahllosen Versuchen abgebrochen. Außerdem schien zu diesem Zeitpunkt die Kristallisation mit einem Inhibitor wesentlich aussichtsreicher.

Später wurde bekannt, dass von den verwendeten *E. coli*-Mutanten auch in der Gruppe von Prof. Greenberg nie eine aufgereinigte, hochkonzentrierte FXIII-Lösung hergestellt werden konnte. Dies war nur Dr. Metzner (Aventis Bering GmbH) mit FXIII aus *S. cerevisiae* gelungen. Leider konnten aber weder ein solcher Hefe-Mutant noch das entsprechende Protokoll genutzt werden.

Aufgrund dessen wird in den folgenden Kapiteln der Weg über die Kristallisation mit Inhibitoren beschrieben. Zwei Inhibitoren für Faktor XIII sind in der Literatur beschrieben. Aus dem großen Amazonas Blutegel (*Haementeria ghilianii*) konnte ein 7,3 kDa schweres Protein mit dem Namen Tridegin isoliert werden, welches sich als sehr guter Inhibitor für Faktor XIII erwies. Die Sequenz des aus 66 Aminosäuren bestehenden Proteins, welches laut Finney *et al.* [83] einen IC_{50} von 9,2 nM besitzt, wurde für die Expression und Aufreinigung leicht abgeändert, wie in Abbildung 4.19 zu sehen ist. Die Unterschiede bestehen aus den zunächst nicht genau bestimmten Aminosäuren, dem angehängten Histidin-Schwanz und einem Austausch auf Position 65. Das an dieser Stelle stehende Arginin musste in ein Leucin umgewandelt werden, weil ansonsten im Laufe der Expression eine proteolytische Spaltung des Proteins durch eine Thrombin-ähnliche Protease beobachtet werden konnte. Dieses modifizierte Tridegin wurde von der Firma Curacyste zur Verfügung gestellt, wobei mit dem verwendeten Material nie der publizierte IC_{50} erreicht werden konnte²⁰.

Des Weiteren ist in der Patentliteratur ein Faktor XIII-Inhibitor mit dem Namen Cerulenin beschrieben (siehe Abb. 4.20), welches kovalent an das Cystein im aktiven Zentrum bindet [86]. Da Cerulenin im Gegensatz zu Tridegin kovalent bindet, durch seine geringe Größe auch kein Problem für die Kristallisation darstellen sollte und von der Firma Calbiochem erhältlich ist, wurden nahezu alle Experimente zur Kristallisation mit diesem Inhibitor durchgeführt.

Zur Überprüfung der Bindung von Cerulenin an Faktor XIIIa wurden Proben mit aktiviertem Faktor XIII mit bzw. ohne Cerulenin hergestellt und anschließend die Massen bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.22 zu sehen. Die Ursache für das stets gefundene Gemisch aus zwei unterschiedlichen Massen für die Faktor XIII-Probe ist unklar. Der Unterschied zwischen der Probe mit bzw. ohne Cerulenin beträgt im Schnitt 219 Da, was der Masse von einem Cerulenin-Molekül entspricht. Damit ist nicht nur die Cerulenin-Bindung an Faktor XIII bewiesen, was parallel dazu auch im Berichrom-Assay bestätigt werden konnte, sondern auch die Tatsache, dass nur ein Ceruleninmolekül pro Monomer bindet. Höchstwahrscheinlich bindet Cerulenin nur am aktiven Zentrum und nicht an andere, freie SH-Gruppen auf der Oberfläche des Proteins. Dieses Problem wird ausgiebig in Abschnitt 5.5 diskutiert. Der endgültige Beweis für die Bindung ans aktive Cystein kann aber letztendlich nur die Struktur oder eine Sequenzierung liefern.

4.3.1 Aktivierung von FXIII und Aufkonzentration

Vor dem Beginn der Kristallisationsexperimente musste FXIII in die aktive Form FXIIIa überführt werden. In der Literatur wird die Aktivierung des Faktor XIII durch Thrombin bei niedrigen Calciumkonzentrationen (ca. 3 mM) beschrieben. Bei der bisher zur Kristallisation verwendeten FXIII-Konzentration von 2 mg/ml trat

¹⁹Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 280 nm. [85]

²⁰Mit dem Berichrom Assay konnte ein IC_{50} von ca. 2,3 μ M bestimmt werden.

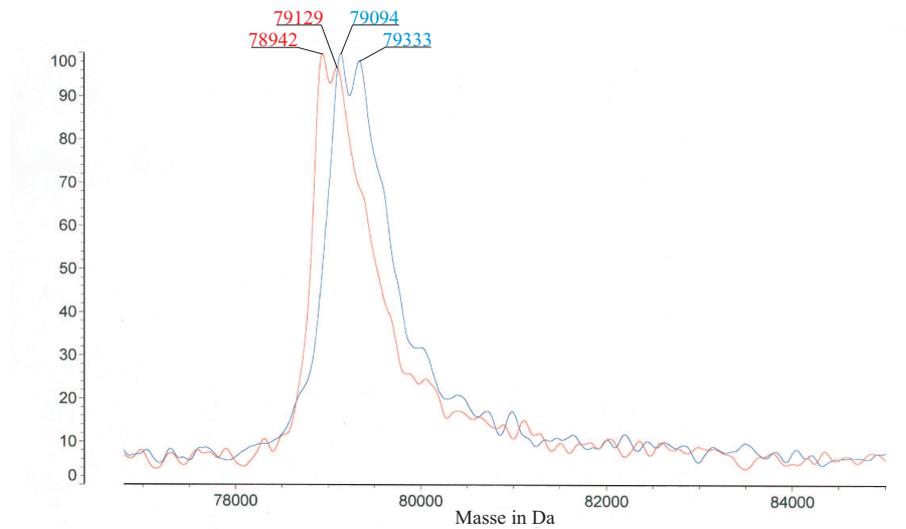


Abbildung 4.22: Vergleich der Massen von Faktor XIIIa (rote Linie, 78 942 Da und 79 094 Da) und des Faktor XIIIa-Cerulatin-Komplexes (blaue Linie, 79 129 Da und 79 333 Da).

jedoch sofort nach der Calciumzugabe eine Trübung der Proteinlösung ein. Die unter diesen Bedingungen im Beisein von Cerulatin gewachsenen Kristalle konnten zwar zur Strukturaufklärung genutzt werden, aber die bestimmte dreidimensionale FXIII-Struktur entsprach der des Zymogens. Obwohl Cerulatin in ausreichender Konzentration vorhanden war, wurde dieses nicht am aktiven Zentrum kovalent gebunden. Offensichtlich ist das aktive Zentrum in diesem Präzipitat nicht zugänglich. Deshalb war es notwendig, die Bedingungen, unter denen die Aktivierung ablief, so zu optimieren, dass eine möglichst hohe Faktor XIIIa-Konzentration in Lösung erreicht wurde. Dies beinhaltete eine vollständige Aktivierung von Faktor XIII durch Thrombin, und die kovalente Bindung von Cerulatin am aktiven Zentrum. Zunächst wurde die Faktor XIII-Konzentration verringert, was gleichzeitig weniger Präzipitat bedeutete. In einer Versuchsreihe mit verschiedenen FXIII-Konzentrationen, wurde die Trübung eines Gemisches von FXIII, 50 mM TRIS pH 7,4, 154 mM NaCl und 3 mM CaCl₂ photometrisch bestimmt. Dabei erwies sich eine Konzentration von 0,1 mg/ml als brauchbarer Kompromiss zwischen einer möglichst hohen FXIII-Konzentration und wenig Präzipitat. Anschließend musste die zur vollständigen Aktivierung nötige Thrombin-Menge ermittelt werden. Das erste Experiment erfolgte mit an Sepharose gekoppeltem Thrombin, wodurch nach der Aktivierung eine Trennung von Thrombin und FXIIIa durch Zentrifugation möglich war. Die eingesetzte Thrombin-Konzentration orientierte sich an den in der Literatur beschriebenen Thrombin-Konzentrationen für Faktor XIII-Aktivierungen [30, 87]. Für eine Kinetik dieser Aktivierung wurden hierzu dem folgenden Ansatz:

- 316 μ l Aktivierungspuffer
- 7 μ l Calciumchloridlösung
- 40 μ l Cerulatin-Stammlösung
- 2 μ l Substrat-Stammlösung
- 40 μ l Sepharose-Thrombin-Stammlösung
- 5 μ l Faktor XIII

Inkubation im Thermomixer bei 37 °C und 1400 U/min

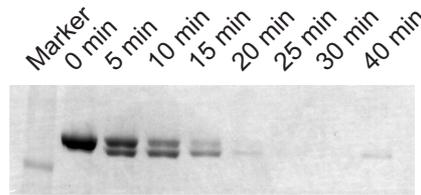


Abbildung 4.23: SDS-Gel der Thrombin-Kinetik mit Sepharose-Thrombin. Ansatz der Thrombin-Aktivierung wie im Text beschrieben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben (je $25 \mu\text{l}$) entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen gestoppt. Spur 1: Marker (62 kD); Spuren 2-9: Kinetik des Sepharose-Thrombin-Verdaus.

zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen²¹.

Die Thrombin-Aktivierung von FXIII zu FXIIIa führt zur Abspaltung der 37 N-terminalen Aminosäuren. Das Ergebnis dieser Kinetik (Abb. 4.23) zeigt, dass sich der zeitliche Verlauf der Aktivierung sehr gut auf einem denaturierenden SDS-Gel verfolgen lässt²². Allerdings nimmt die auf dem Gel sichtbare Menge an FXIII und FXIIIa stark ab. Nach 20 min ist FXIII kaum noch nachweisbar. Vermutlich bindet FXIIIa an die zugegebene Sepharose. Um dies näher zu untersuchen, wurde eine Kinetik mit in wässrigem Puffer gelösten Thrombin durchgeführt, welches nach der Aktivierung durch einen spezifischen Inhibitor (PPACK) inaktiviert wird und in der Lösung verbleibt.

Hierzu wurden dem folgenden Ansatz:

345 μl	Aktivierungspuffer
4 μl	Calciumchloridlösung
40 μl	Cerulein-Stammlösung
2 μl	Substrat-Stammlösung
4 μl	Thrombin-Stammlösung
5 μl	Faktor XIII

Inkubation bei 37°C , mit 1400 U/min schütteln

zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, zentrifugiert und der Überstand auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Der erste Versuch mit gelöstem Thrombin — auch hier wurden die Konzentrationen entsprechend der in der Literatur angegebenen Werte gewählt — zeigte den erwarteten Verlauf (siehe Abb. 4.24). Die Thrombin-Konzentration musste jedoch noch erhöht werden, da selbst nach 60 min bei 37°C noch ein nicht unerheblicher Teil der eingesetzten Faktor XIII-Menge als Zymogen vorlag.

In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Cerulein weder die Aktivierung noch die Aufkonzentration von FXIII behindert (siehe Abb. 4.25). Außerdem ist für die Bindung von Cerulein die Anwesenheit eines Substratpeptids nicht notwendig. Deshalb konnte in den folgenden Versuchen

²¹Auch eventuell vorhandene Pellets wurden bei den Experimenten zur Aktivierung und Aufkonzentration stets auf einem SDS-Gel analysiert. Sie enthielten die komplementäre Menge an Protein, weshalb in dieser Arbeit aus Platzgründen auf eine Abbildung dieser Pellet-Gele verzichtet wurde.

²²Aus Platzgründen werden in der Regel nur Ausschnitte der angefertigten Gele gezeigt, ohne dabei aber wichtige Details wegzulassen.

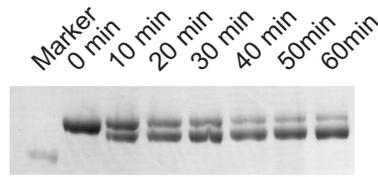


Abbildung 4.24: SDS-Gel der Thrombin-Kinetik mit gelöstem Thrombin. Ansatz der Thrombin-Aktivierung wie im Text beschrieben. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben ($25 \mu\text{l}$) entnommen und die Reaktion durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen abgebrochen. Spur 1: Marker (62 kD); Spuren 2-8: Kinetik des Thrombin-Verdaus.



Abbildung 4.25: Aktivierung von FXIII und anschließende Aufkonzentration ohne Zusätze (A), mit Cerulenin (B), bzw. mit Cerulenin und Substratpeptid (C). Spur 1: Marker (62 kD); Spuren 2 und 3: verschiedene FXIII-Konzentrationen; Spur 4-6: Thrombin-Verdau für 60 min in Abwesenheit von Cerulenin; Spur 7-9: Thrombin-Verdau für 60 min in Anwesenheit von Cerulenin; Spur 10-12: Thrombin-Verdau für 60 min in Anwesenheit von Cerulenin und Substratpeptid; Konz.: Proben nach Aufkonzentration mittels Ultrafiltration.

auf die Zugabe von Substratpeptid verzichtet werden. Bei dem anschließenden Aktivitätstest (Berichrom Assay) wurde bestätigt, dass Cerulenin am aktiven Zentrum gebunden hatte²³ (Abb. 4.26).

In weiteren Kinetik-Experimenten musste die zugegebene Thrombin-Menge optimiert werden, da die bisherige Menge für eine vollständige Aktivierung nicht ausreichend war (siehe Abb. 4.24). In Abb. 4.27 ist die FXIII-Aktivierung mit $0,86 \text{ U}$ Thrombin auf $43 \mu\text{g}$ FXIII dargestellt. Bei der hier eingesetzten Menge an Thrombin ist nach etwa 50 min fast der gesamte Faktor XIII in Faktor XIIIa umgewandelt. Nach längerer Inkubation mit Thrombin sinkt die Konzentration an FXIIIa wieder, ohne dass auf dem Gel eine neue Bande sichtbar wird. Offensichtlich kommt es zu einer Präzipitation des Faktor XIIIa, wobei der Mechanismus hierfür unklar ist. Auch nach 120 min konnte keine zusätzliche Proteinbande durch Thrombinverdau beobachtet werden, obwohl die gefundene Konzentration an FXIIIa deutlich unter der eingesetzten Konzentration liegt. FXIIIa wird demnach durch das anwesende Thrombin nicht proteolytisch gespalten, aber er scheint zu denaturieren.

Trotz der Stabilität von FXIIIa gegenüber Thrombin schien es ratsam, das Thrombin nach erfolgter FXIII-Aktivierung zu deaktivieren. Deshalb wurde anschließend die für das eingesetzte Thrombin benötigte Menge an PPACK bestimmt. Dafür wurde die Thrombin-Aktivität mit einem p-Nitroanilid-Substrat gemessen

²³Ein Beweis dafür, dass Cerulenin anstatt am aktiven Zentrum möglicherweise an eine andere Stelle bindet und damit die Aktivität des Enzyms blockiert, konnte nicht erbracht werden. Allerdings ist dies aufgrund der Ergebnisse auch nicht sehr wahrscheinlich (siehe dazu auch Abschnitt 5.5).

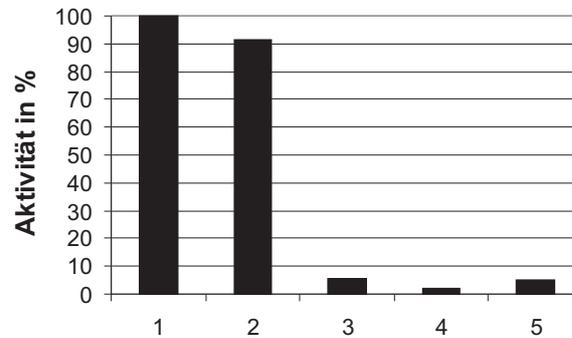


Abbildung 4.26: Vergleich der FXIII-Aktivitäten der in Abb. 4.25 dargestellten Proben (vor der Aufkonzentration). Die Aktivität wurde im Berichrom Assay bestimmt. Probe 1: Kontrolle (=100 % Aktivität), Probe 2: FXIIIa, Probe 3: FXIIIa mit 1,2 mg/ml Cerulenin, Probe 4: FXIIIa mit 1,2 mg/ml Cerulenin und 0,1 mg/ml Substratpeptid, Probe 5: Kontrolle ohne FXIII (Nullprobe).

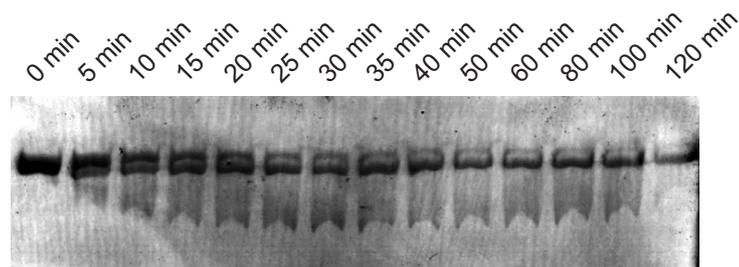


Abbildung 4.27: Aktivierung von FXIII durch Thrombin. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben (je 25 μ l) entnommen und die Reaktion durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer und Erhitzen gestoppt.

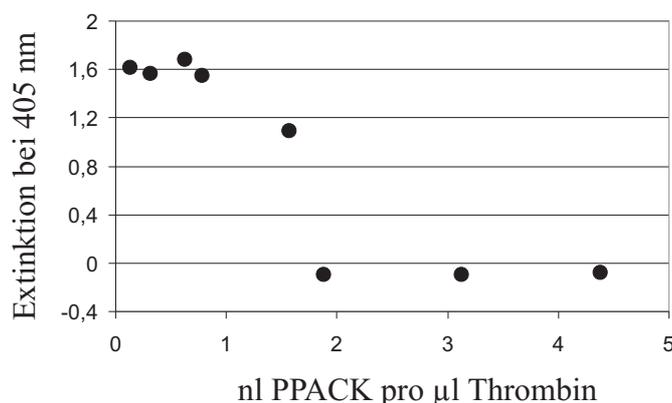


Abbildung 4.28: Bestimmung der zur Inhibition von Thrombin notwendigen PPACK-Menge (siehe Abschnitt 3.8). Die PPACK-Konzentration wurde sukzessiv bis zur vollständigen Inhibition der Thrombin-Aktivität erhöht (Angabe in nl PPACK-Stammlösung pro ml Aktivierungsansatz; 2,23 U Thrombin pro ml).

und die PPACK-Konzentration sukzessive bis zum vollständigen Unterdrücken der Thrombin-Aktivität erhöht (Abb. 4.28).

Das aus den vorangegangenen Experimenten erstellte Aktivierungsprotokoll, welches im Folgenden aufgelistet ist, bildete die Grundlage für alle weiteren Experimente:

In ein Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden in der angegebenen Reihenfolge

385 μl	Aktivierungspuffer
4 μl	CaCl_2
6,3 μl	Thrombin (0,143 U/ μl)
und 4,3 μl	Faktor XIII (8,6 mg/ml) pipettiert.

Dieser Ansatz wurde 60 min bei 37 °C mit 1200 min^{-1} geschüttelt und anschließend mit 2 μl PPACK²⁴ ($c = 6,6 \mu\text{g}/\text{ml}$, dies entspricht einer 1:100 Verdünnung der PPACK-Stammlösung) abgestoppt. Nach erfolgter Aktivierung wurden die Proteinproben 5 min bei 13 000 g zentrifugiert.

Vor der Optimierung der Aktivierungsbedingungen war nach der Zentrifugation ein weißes Pellet sichtbar, das aber im Laufe der Optimierung schließlich verschwand. In den Experimenten zur Verbesserung der FXIIIa-Löslichkeit wurde die gelöste Proteinmenge sowohl durch SDS-Gelelektrophorese als auch durch die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Überstand mittels Bradford Protein Assay analysiert. Anschließend wurde mit der gemessenen Proteinkonzentration die Ausbeute (erhaltene Stoffmenge dividiert durch die eingesetzte Stoffmenge) ausgerechnet. Unter Berücksichtigung der nahezu vollständigen Aktivierung und der geringen eingesetzten Thrombin-Konzentration (0,74 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kann näherungsweise die gemessene Gesamtproteinmenge der Menge an löslichem FXIIIa gleichgesetzt werden. Da die Proteinkonzentrationsbestimmungen regelmäßig die Ergebnisse der Gelelektrophorese bestätigten, wurden diese Ergebnisse nicht in allen Fällen abgebildet.

Die ersten Untersuchungen konzentrierten sich auf den Einfluss von pH-Wert, Salz, Detergenzien, Glycerin und EDTA. Die in den Abbildungen 4.29 und 4.30

²⁴Anhand der in 4.28 gezeigten Ergebnisse sollten 2 nl PPACK pro μl Thrombin ausreichend sein, was in diesem Fall einem Volumen 1,26 μl entsprechen würde. Die eingesetzten 2 μl sind demnach vollkommen ausreichend.

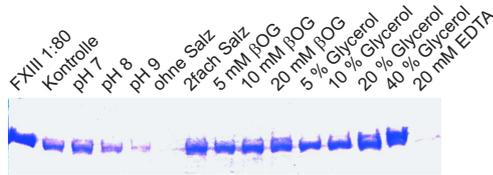


Abbildung 4.29: SDS-Gel der Überstände von den Aktivierungsansätzen.

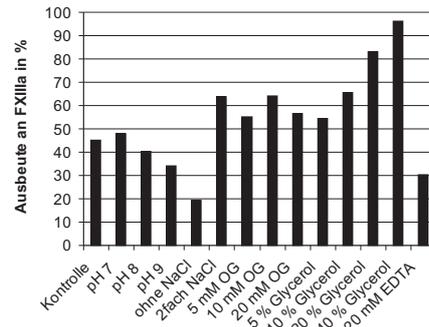


Abbildung 4.30: Erzielte Ausbeuten der in Abb. 4.29 gezeigten Proben.



Abbildung 4.31: Vergleich der Wirkung verschiedener Detergenzien auf die Löslichkeit von FXIIIa.

dargestellten Ergebnisse zeigen deutlich, dass besonders erhöhte Salz- sowie hohe Glycerin-Konzentrationen einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit von FXIIIa haben. Allerdings kam es bei hohen Glycerinkonzentrationen aufgrund der erhöhten Viskosität der Lösung gleichzeitig zu einer deutlichen Verlangsamung der Aktivierung (Abb. 4.29, Spur 14).

Spätere Kontrollexperimente bestätigten den positiven Einfluss von Glycerin und Salz (Abb. 4.33). Experimente zum Einfluss von Detergenzien auf die Ausbeute an löslichem FXIIIa, deren Ergebnisse in Abb. 4.30 und Abb. 4.31 zu sehen sind, belegten den positiven Effekt dieser Substanzen auf die Löslichkeit von FXIIIa. Das ionische Detergenz CHAPS fiel dabei besonders positiv auf, während Dodecylmaltosid (DodOMalt) und β -Octylglucosid (β OG) nur wenig Wirkung zeigten.

Parallel dazu wurde die Aktivierung von Faktor XIII durch Thrombin in Abwesenheit von Calcium bzw. in Anwesenheit großer Mengen an Calcium, untersucht. Überraschenderweise kommt es in beiden Fällen zu einer schnellen Präzipitation, wie in Abb. 4.32 deutlich erkennbar ist. Weder das Fehlen noch zu hohe Konzentrationen an Calcium werden von Faktor XIIIa toleriert.

Im Folgenden galt es, die bisherigen Ergebnisse zu bestätigen und näher zu untersuchen, inwieweit der positive Effekt von Glycerin, Salz und Detergenz kombinierbar ist. In Abb. 4.33 sind die Ergebnisse zu sehen. Der Unterschied zwischen 1 mM und 2 mM CHAPS erscheint gering, obwohl eine Steigerung der CHAPS-Konzentration

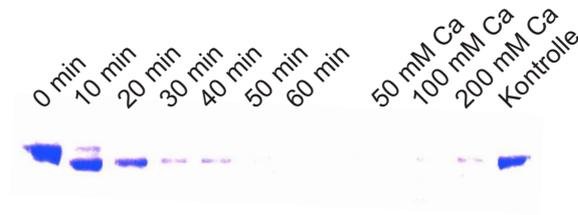


Abbildung 4.32: Einfluss von Ca^{2+} auf die Aktivierung von FXIII. Alle gezeigten Proben enthielten Thrombin. Spuren 1 bis 7: Kinetik der Aktivierung in Abwesenheit von Ca^{2+} ; Spuren 8 bis 11: Aktivierung in Anwesenheit verschiedener Ca^{2+} -Konzentrationen; Spur 12: Standardbedingungen als Kontrolle.

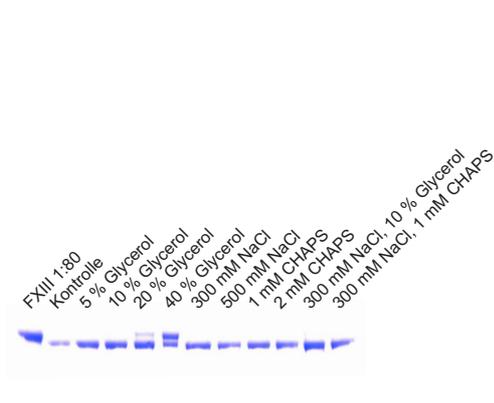


Abbildung 4.33: Der Effekt von Glycerin, Salz, CHAPS und Kombinationen dieser Agentien.

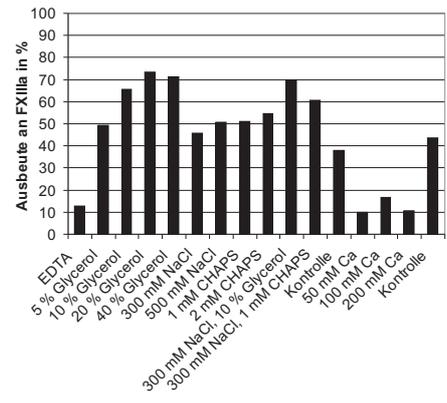


Abbildung 4.34: Ausbeute der in Abb. 4.33 gezeigten Proben.

durchaus zu einer besseren Ausbeute führt, wie spätere Experimente belegen. Eine Kombination von CHAPS und Salz verbessert die Ausbeute zusätzlich. Des Weiteren zeigte diese Versuchsreihe, dass sich der positive Effekt von Glycerin nicht beliebig skalieren lässt, sondern bei etwa 20 % sein Maximum erreicht. Außerdem kommt es bei höheren Glycerinkonzentrationen aufgrund der Viskosität der Lösung zur Beeinträchtigung der Aktivierung, was eindeutig bei 40 % Glycerin anhand der zweiten Bande zu erkennen ist (Abb. 4.33, Spur 6). Unter diesen Bedingungen müsste länger aktiviert oder die Thrombin-Konzentration erhöht werden. Beide Varianten haben aber auch Nachteile. Eine längere Aktivierung kann zu größeren Verlusten führen, was eindeutig in Abb. 4.27 zu sehen ist. Eine Erhöhung der Thrombin-Konzentration führt aber zu einer größeren „Verunreinigung“ der Proteinklösung mit Thrombin und PPACK, was bei der anschließenden Kristallisation zu Problemen führen kann. Bei den beiden hier verwendeten Salz-Konzentrationen ist zwar ein Unterschied in der Ausbeute an löslichem Faktor XIIIa erkennbar, aber eine Steigerung von 300 mM auf 500 mM NaCl bringt keinen großen Gewinn. Auch hier ist mit Rücksicht auf die Kristallisation die geringere Konzentration zu bevorzugen.

In weiteren Experimenten konnte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bestätigt und Kombinationen aus Glycerin, Salz und Detergenz getestet werden. Es erwies sich eine Kombination aus Glycerin, Kochsalz und CHAPS als sehr gut für die Aktivierung von Faktor XIII geeignet. Die genauen Konzentrationen dieser Zusätze wurden in diversen Versuchen variiert, um das beste Mischungsverhältnis in Bezug auf die FXIIIa-Ausbeute zu ermitteln. Zusätzlich wurde eine mögliche Aktivierung von Faktor XIII ohne Thrombin untersucht. Letzteres wird in der Literatur mit hohen Calcium-Konzentrationen (> 50 mM) oder mit sehr hohen Konzentrationen anderer Salze (z. B. 1 M NaCl) beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.2 auf Seite 6). Allerdings lag die Ausbeute bei der Thrombin-freien Aktivierung nur bei ca. 10 % und war deshalb nicht praktikabel.

Entsprechend der Erfahrungen mit Faktor XIII ist eine FXIIIa-Konzentration von mindestens 2 mg/ml für die Kristallisation notwendig. Diese Konzentration kann durch eine entsprechende Erhöhung der Proteinkonzentration vor der Aktivierung erreicht werden. Leider führt dies aber zu extrem hohen Verlusten, wie entsprechende Versuche ergaben (Ergebnisse hier nicht gezeigt). Deshalb wurde eine Aufkonzentration mittels Ultrafiltration angewendet. Mit dieser Methode ließen sich sogar die Konzentration von mehr als 2 mg/ml erzielen. Dieser zusätzliche Schritt wirkte sich aber auch negativ auf die Ausbeute aus. Üblicherweise lag die Ausbeute nach der Aktivierung bei 80–90 % der eingesetzten Menge, wohingegen nach der Aufkonzentration nur noch reichlich 40 % vorhanden waren.

Auf Grundlage aller Ergebnisse wurde deshalb folgende Kombination als „optimale“ Bedingung ausgewählt: 15 % Glycerin, 300 mM NaCl und 4 mM CHAPS. Zusätzlich wurde die bisher verwendete Ausgangskonzentration von Faktor XIII verdoppelt (von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ auf 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Aufgrund der Erhöhung der bisher verwendeten Glycerin-Konzentration von 10 % auf 15 % wurde im Gegenzug dafür die Zeit für die Thrombin-Aktivierung verlängert. Unter diesen Bedingungen wurde im nächsten Schritt untersucht, ob der so erzeugte Faktor XIIIa auch wirklich aktiv und das aktive Zentrum für Cerulenin bzw. Tridegin zugänglich ist.

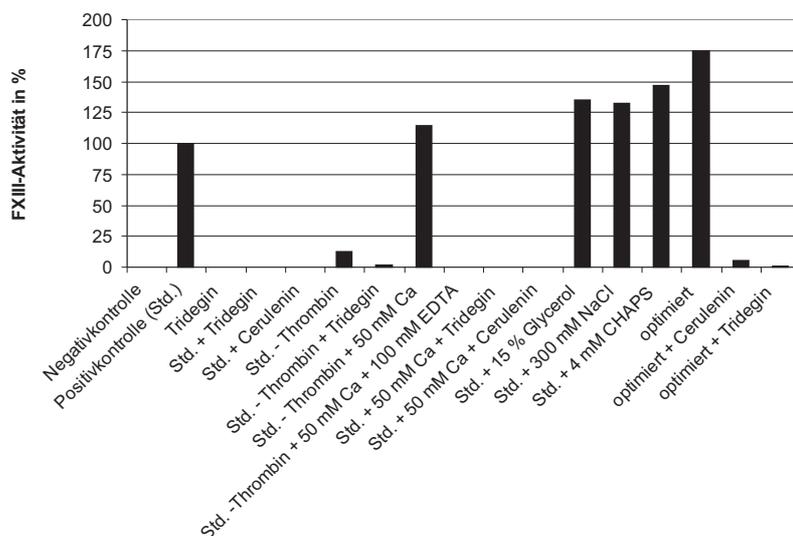


Abbildung 4.35: Vergleich der FXIII-Aktivitäten unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen. - Thrombin: Thrombin mit PPACK inaktiviert; Std.: Referenzbedingungen vor der Optimierung; optimierte Bedingungen: 15 % Glycerin, 300 mM NaCl, 4 mM CHAPS, 0,2 mg/ml FXIII, 50 mM Tris/HCl pH 7,4; Tridegin 5 μ M; Cerulenin 0,12 mg/ml.

Die dafür notwendigen Aktivitätstests wurden mit dem Berichrom-Assay durchgeführt. Es wurde von allen Proben eine Doppelbestimmung vorgenommen und der Durchschnitt für die Berechnung der Aktivität herangezogen. Die Aktivität wurde in Prozent angegeben, wobei 0 % der Nullprobe (kein Faktor XIII enthalten) und 100 % der Blindprobe (bestimmte Menge an Faktor XIII) zugeordnet sind. Die in Abb. 4.35 gezeigten Ergebnisse belegen eindeutig, dass die veränderten Bedingungen nicht das Binden der Inhibitoren verhindern. Sowohl Cerulenin als auch Tridegin können die FXIIIa-Aktivität unterbinden. Auch wenn die eingesetzte Menge an Cerulenin scheinbar nicht für eine vollständige Inhibition ausreicht, so wurde in nachfolgenden Kontrollexperimenten bewiesen, dass es sich bei der Restaktivität um ein Artefakt handelt. Eine Aktivierung ohne Thrombin mit 50 mM Calcium ist möglich, allerdings wurde schon in vorangegangenen Experimenten unter diesen Bedingungen eine schlechte Ausbeute verzeichnet.

Die gemessenen Aktivitäten bestätigen in etwa die bereits zuvor bestimmten Ausbeuten an FXIIIa. So ist in Abb. 4.35 der Effekt von Glycerin, NaCl und CHAPS zunächst einzeln und anschließend die Kombination von allen zusammen dargestellt, wobei die Kombination die höchste Aktivität aufweist. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die optimierten Bedingungen die Inhibition von FXIIIa durch Cerulenin und Tridegin nicht behindern. Das aktive Zentrum des erzeugten FXIIIa ist für die kovalente Bindung von Cerulenin zugänglich, was eine wichtige Voraussetzung für die Kristallisation darstellt.

Zur Beantwortung der Fragestellung, ob es als Folge der Aktivierung zu einem Zerfall des Dimers in zwei Monomere kommt, kam die Methode der analytischen Gelfiltration zum Einsatz²⁵. Dafür wurde eine Superose 12 Säule der Firma Pharmacia verwendet. Der Laufpuffer entsprach dem Aktivierungspuffer (15 % Glycerin, 300 mM NaCl, 4 mM CHAPS, pH 7,5). Das Chromatogramm der Gelfiltrationsläufe

²⁵Diese Arbeiten wurden freundlicherweise von Dr. Stöckel, Curacyte, durchgeführt.

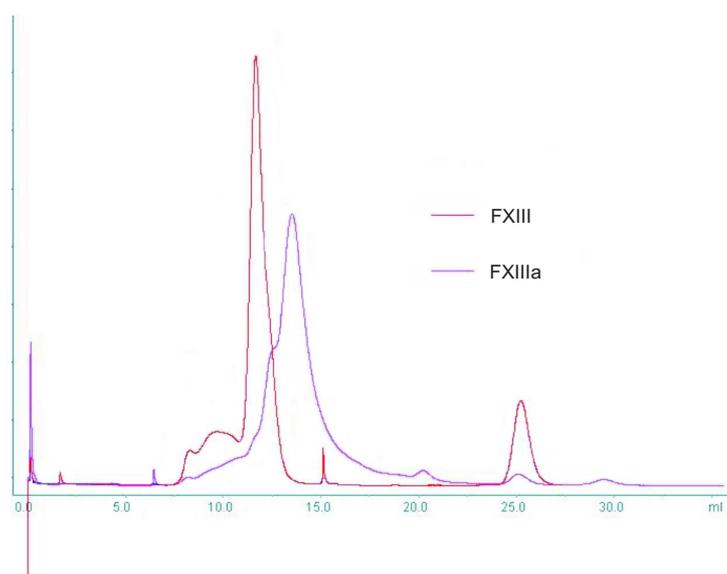


Abbildung 4.36: Gelfiltration von FXIII und aktiviertem FXIIIa. Die gemessenen Absorptionen bei 280 nm wurden zur Vereinfachung des Vergleichs übereinander gelegt.

zeigt deutliche Unterschiede zwischen FXIII und FXIIIa (Abb. 4.36). Die Hauptmenge an FXIIIa kann bei einem deutlich niedrigeren Molekulargewicht als FXIII nachgewiesen werden. Kontroll-Chromatogramme mit verschiedenen Eichproteinen ergaben, dass FXIIIa wahrscheinlich als Monomer bei den gewählten Laufbedingungen vorliegt (Chromatogramme nicht gezeigt). Die SDS-Gele der einzelnen Fraktionen der Gelfiltration bestätigten dies. FXIII liegt hauptsächlich als Dimer vor, FXIIIa hingegen als Monomer. Außerdem ist weder in dem Chromatogramm der Gelfiltration noch in den SDS-Gele ein nennenswerter Anteil an Aggregaten zu beobachten. Die FXIIIa-Präparationen sind demnach für Kristallisationsexperimente geeignet.

Für die Kristallisation von Proteinen ist es nicht nur wichtig, dass das Material möglichst rein und ausreichend konzentriert ist, es muss auch über einen längeren Zeitraum stabil sein, da die Kristallisation in der Regel einige Tage in Anspruch nimmt. Weil der inaktive Komplex FXIIIa-Cerulein nicht mit dem für solche Zwecke am besten geeigneten Test, dem Aktivitätstest, untersucht werden kann, wurde hierfür FXIIIa ohne Inhibitor verwendet. Nach Aktivierung und Aufkonzentration auf etwa 1 mg/ml bei geeigneten Bedingungen (15 % Glycerin, 300 mM NaCl und 4 mM CHAPS, siehe oben) lagerte die Lösung mehrere Tage bei 4 °C. In regelmäßige Abständen wurden Proben entnommen, auf -80 °C abgekühlt und anschließend bei dieser Temperatur gelagert. So konnten alle Proben unter gleichen Bedingungen vermessen werden.

Das in Abb. 4.37 dargestellte Ergebnis zeigt eine deutliche Abnahme der Aktivität über einen Zeitraum von 30 Tagen²⁶. Unter Berücksichtigung aller Werte vom 2. bis zum 16. Tag kann aus diesen Daten eine mittlere Halbwertszeit von 10 Tagen errechnet werden. Anders ausgedrückt verliert FXIIIa bei 4 °C jeden Tag etwa 7 % seiner Aktivität. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, dass für die Kristallisation der Komplex mit einem irreversibel gebundenen Inhibitor verwendet wurde. Diese Modifikation sollte die Stabilität weiter erhöhen und somit ausreichende Stabilität für die Kristallisationsversuche gewährleisten.

²⁶Die unerwartet hohe Aktivität der 1. Probe und das limitierte Probenvolumen verhinderten leider eine genaue Bestimmung der Aktivität mit dem Berichrom-Assay.

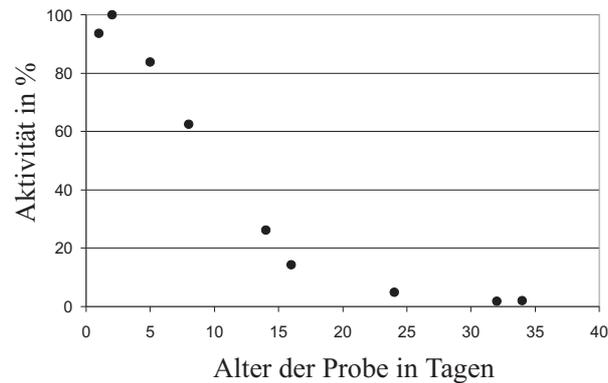


Abbildung 4.37: Ergebnis des Stabilitätstests von FXIIIa.

4.3.2 Kristallisationsversuche mit und ohne Inhibitoren

Bereits im Jahre 1995 erschien eine Veröffentlichung über den Versuch der Kristallisation von aktiviertem Faktor XIII [47]. Darin wird beschrieben, dass es nach erfolgter proteolytischer Abspaltung des Aktivierungspeptids durch Thrombin wahrscheinlich zu keiner Trennung von Faktor XIII(a) und dem Aktivierungspeptid kommt. Dies wurde mit einer Kristallstruktur belegt, die Faktor XIII nach dem Thrombinverdau mit dem Peptid in der bekannten Zymogenstruktur zeigt. Interessant ist die Tatsache, dass über die Details der Aktivierung und Kristallisation nichts in der Publikation zu lesen ist. Bei den ersten Versuchen zur Kristallisation von FXIIIa erfolgte deshalb die Aktivierung im Kristallisationstropfen, wie bereits in Abschnitt 4.3.1 auf Seite 54 erwähnt. Gleichzeitig waren Cerulenin bzw. Tridegin anwesend, um das nach erfolgter Aktivierung zugängliche aktive Zentrum zu blockieren und einen „Rückfall“ in die Zymogenstruktur zu vermeiden. Als Kristallisationsbedingungen wurden die vom Zymogen bekannten Bedingungen mit 0,1 M MES bei pH-Werten von 6,2 bis 6,5 verwendet. Es bildeten sich innerhalb weniger Tage auch erste Kristalle, die eine Größe von etwa $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ erreichten. Am Synchrotron in Hamburg konnten von diesen Kristallen auch Datensätze bis $2,7 \text{ \AA}$ im Falle von Cerulenin bzw. $2,15 \text{ \AA}$ im Falle von Tridegin gesammelt werden. Die Strukturen entsprachen aber der bereits bekannten Zymogenstruktur mit einem nicht zugänglichen aktiven Zentrum. Allerdings war die proteolytische Spaltung nach Arg37 durch Thrombin erfolgreich, insofern man dies anhand der nur bedingt aussagefähigen Elektronendichte in diesem flexiblen Bereich sagen kann.

Nachdem die „optimalen“ Bedingungen zur Aktivierung von FXIII und der Aufkonzentration von FXIIIa bestimmt worden waren (15 % Glycerin, 300 mM NaCl, 4 mM CHAPS, 50 mM TRIS-HCl pH 7,4 und 0,2 mg/ml Faktor XIII), konnten neue Kristallisationsversuche angegangen werden. Um sicherzustellen, dass bei den Kristallisationsansätzen stets mit aktiviertem Faktor XIII gearbeitet wurde, erfolgte nach jeder Aktivierung und Aufkonzentration einer neuen Charge eine Kontrolle der Aktivierung per SDS-Gel (ein Beispiel siehe Abb. 4.38) und eine Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford Assay. Es ergaben sich immer Konzentrationen von etwa 2 mg/ml. Für jede getestete Kristallisationsbedingung wurde $1 \mu\text{l}$ von dieser Proteinlösung mit $1 \mu\text{l}$ Reservoir gemischt und die Kristallisationsplatten anschließend in einen auf 20°C temperierten Raum gestellt.

Für die ersten Ansätze wurden der Grid Screen Polyethylene 6000, der Grid Screen Ammonium Sulfate (beide Hampton Research Corp.) sowie die Kristallisationsbedingungen für das Zymogen ausgewählt. Zusätzlich wurde die Kristallisation gegen Wasser untersucht, da sich beim Mischen von aufkonzentriertem FXIIIa

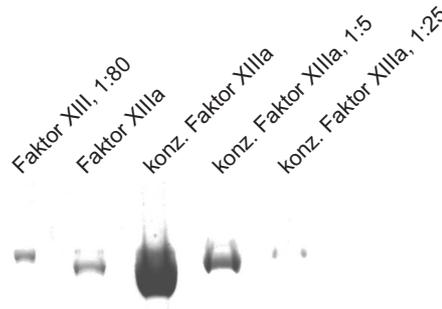


Abbildung 4.38: SDS-Gel mit Faktor XIIIa vor der Kristallisation.

und Wasser ein Niederschlag bildete. Außerdem enthält das Reservoir bei der Kristallisation von Faktor XIII (Zymogen) auch nur 0,1 M MES und keine weiteren Fällungsmittel. Unter allen Bedingungen zeigte sich schon kurz nach dem Mischen von Reservoir und Proteinlösung ein Niederschlag. Da dies auch bei der Verwendung von Wasser zu beobachten war, konnte dies nicht die Folge einer zu hohen Proteinkonzentration sein. Wahrscheinlich ist die Ursache für das partielle Ausfallen des Faktor XIIIa die Verringerung der Glycerin-, NaCl- und CHAPS-Konzentration. Schließlich haben diese Zusätze einen großen Einfluss auf die Löslichkeit und Stabilität von FXIIIa. Es ist an dieser Stelle anzumerken, dass das Zymogen ein ähnliches Verhalten zeigt, wie in Abschnitt 4.1 nachzulesen ist.

Bei hohen Ammoniumsulfat-Konzentrationen konnte nach einigen Tagen unabhängig vom pH-Wert eine Phasentrennung beobachtet werden, die mit Methylblau angefärbt werden konnte. Es bildeten sich kleine, kugelförmige Tröpfchen, die scheinbar hochkonzentriertes Protein enthielten, welches sich jedoch nicht wie in einem Kristall regelmäßig anordnete. Bei einem Test mit reinem Puffer, d. h. ohne Protein, bildeten sich jedoch die gleichen kugelförmigen Tröpfchen. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich hierbei nur um Detergenz handelt, das aufgrund der hohen Salzkonzentration eine zweite Phase bildet.

Anschließend wurden JBScreen 1 bis 10 (JenaBioscience), Crystal Screen 1, Crystal Screen 2, Grid Screen PEG/LiCl, Grid Screen 2-Methyl-2,4-pentandiol und Quik Screen (alle Hampton Research Corp.) verwendet, um geeignete Startbedingungen für die Kristallisation zu finden. Wie schon bei den ersten Ansätzen, war auch bei diesen Bedingungen bis auf wenige Ausnahmen gleich nach dem Mischen von Proteinlösung und Reservoir ein Niederschlag zu beobachten. Die wenigen klaren Tropfen enthielten in der Regel Polyethylenglycol (PEG) in verschiedenen Größen und Konzentrationen. Dieser Zusatz ist ähnlich wie Glycerin dafür bekannt, stabilisierend auf Proteine zu wirken. In allen anderen Tropfen bildete sich teils grober, teils feiner Niederschlag. Eine ähnliche Phasentrennung wie bereits beschrieben, konnte in weiteren Bedingungen beobachtet werden, die alle hohe Konzentrationen an Sulfat- bzw. Citrationen aufwiesen. In einem Tropfen entstanden bei 1,4 M NaKHPO₄, pH 6,9 große, scharfkantige Kristalle, die jedoch später als Salzkristalle identifiziert werden mussten.

Am Ende musste aber festgestellt werden, dass trotz umfangreicher Tests von etwa 450 verschiedenen Bedingungen keine geeigneten Kristallisationsbedingungen gefunden werden konnten. Aus diesem Grund musste ein zweiter Anlauf unternommen werden, der auf den bisher gesammelten Erfahrungen aufbaute. Auffällig ist das Auftreten von Niederschlag in fast allen Tropfen. Wie bereits erwähnt, kann dieses Phänomen nicht mit einer zu hohen Protein- bzw. Fällungsmittelkonzentration zusammenhängen. Im Prinzip ist das Vorhandensein von Niederschlag kein schlech-

tes Zeichen. Kristalle können sich nur dann bilden, wenn nicht alle Proteinmoleküle in Lösung gehalten werden können. Allerdings ordnen sich in diesem Fall die Proteinmoleküle nicht zu regelmäßigen Kristallen an, sondern bilden nur ungeordnete Präzipitate. Die Ursachen können vielschichtig sein. Liegt es am Protein selbst, weil es z. B. zu instabil ist, gäbe es wenige Möglichkeiten, dies zu beeinflussen. Es ist aber auch möglich, dass eine Substanz im Ansatz die Kristallisation stört oder nicht in der notwendigen Konzentration vorliegt. Als ein möglicher Ansatzpunkt ist somit eine Veränderung der Konzentration der verschiedenen Zusätze denkbar, auch wenn dies zu größeren Verlusten bei der Herstellung von hochkonzentrierter Faktor XIIIa-Lösung führen würde. Aus diesem Grund waren neue Experimente zur Aufkonzentration von FXIIIa notwendig.

4.3.3 Versuche zur Aufkonzentration und Kristallisation ohne CHAPS

Nachdem die umfangreichen Kristallisationsansätze zu keinem positiven Ergebnis führten, wurden die zugegebenen Substanzen auf ihre Bedeutung für die FXIIIa-Herstellung geprüft. Die Bedeutung von NaCl war bereits in vorangegangenen Experimenten hinlänglich untersucht worden. Außerdem war NaCl am wenigsten verdächtig, die Kristallisation zu behindern, da es ein häufig anzutreffender Kristallisationszusatz ist. Daher blieben nur Glycerin und CHAPS übrig, wobei besonders CHAPS als Detergenz ein potentieller Störfaktor sein konnte. Glycerin hingegen ist ein oft genutzter Zusatz zur Stabilisierung von Proteinen. Als Referenz galten die bisher verwendeten Bedingungen mit 15 % Glycerin, 300 mM NaCl und 4 mM CHAPS. Es wurde deshalb untersucht, wie sich das Weglassen von Glycerin oder CHAPS auswirkte und welchen Einfluss ein Austausch von CHAPS gegen β OG haben würde.

Es zeigte sich, dass CHAPS eine große Rolle bei der Aktivierung spielt, aber weniger wichtig für die Aufkonzentration ist. Des Weiteren kann CHAPS nur bedingt durch β OG ersetzt und auf Glycerin kann überhaupt nicht verzichtet werden. Insbesondere für die Aufkonzentration ist Glycerin von enormer Bedeutung.

Das hergestellte Material wurde zur Kontrolle gleich für einige Kristallisationsansätze verwendet. Da es sich nur um eine kleine Menge FXIIIa handelte, kamen exemplarisch nur Grid Screen Ammonium Sulfate und ein Teil²⁷ des Crystal Screen 1 (beide von der Firma Hampton Research) zum Einsatz. Es bildete sich wieder in fast allen Tropfen ein Präzipitat, wobei die klaren Tropfen hohe PEG-Konzentrationen enthielten. Etwas überraschend war die Beobachtung, dass sich die bereits erwähnte Phasentrennung nur bei der Verwendung von CHAPS ausbildete, jedoch nicht beim Einsatz von β OG.

Im Ergebnis war auf Glycerin nicht und auf CHAPS nur bedingt zu verzichten. Da mit beiden Stoffen aber bisher jeder Kristallisationsversuch gescheitert war, wurde versucht, wenigstens auf das Detergenz zu verzichten. Die geringe Ausbeute sollte durch den Einsatz einer erhöhten FXIII-Konzentration ausgeglichen werden.

Aufgrund der Ergebnisse wurden mit einer FXIII-Anfangskonzentration von 1,5 mg/ml erneut FXIIIa für Kristallisationsversuche erzeugt. In früheren Kristallisationsansätzen waren teilweise Verunreinigungen in Form von kleinen Klumpen denaturierten Proteins enthalten, die höchstwahrscheinlich bei der Aufkonzentration entstanden. Diese Aggregate störten die Auswertung, weshalb nun nach Abschluss der Aufkonzentration eine Filtration durch einen 0,1 μ m Filter erfolgte. Bei diesem Schritt sank die gemessene Proteinkonzentration um knapp 6,5%. Bei der so erhaltenen Proteinlösung konnte eine Proteinkonzentration von 3,5 mg/ml bestimmt

²⁷Es wurden nur die ersten 24 Bedingungen verwendet, was einer Kristallisationsplatte entspricht.

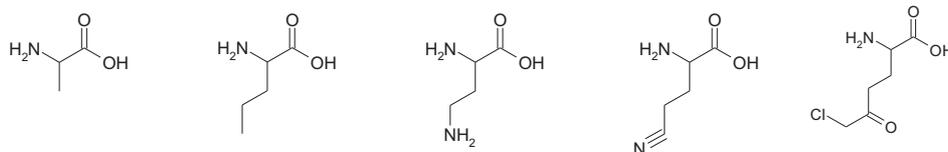


Abbildung 4.39: Die anstatt Glutamin in die Peptide eingebauten Aminosäuren Alanin (Ala), Norvalin (Nva), Diaminobuttersäure (Dab) und das Nitril (GlcN) (v.l.).

Abbildung 4.40: Das gewünschte Chlor-methylketon.

werden. Diese wurde erneut für Kristallisationsansätze verwendet. Dabei kamen die bereits genutzten Screening Kits der Firmen JenaBioscience und Hampton Research sowie die Kristallisationsbedingungen des Zymogens zum Einsatz. Leider konnten auch hier keine erfolgreichen Kristallisationsbedingungen gefunden werden. Es bildete sich wieder in fast allen Tropfen ein Niederschlag, der in der Regel sofort nach dem Mischen von Protein- und Reservoir-Lösung sichtbar wurde. Das ist ein deutliches Zeichen dafür, dass die Proteinkonzentration nicht zu niedrig ist. Aber trotzdem konnten keine geordneten Proteinkristalle wachsen. Mögliche Ursachen für das Scheitern der Kristallisation von aktiviertem Faktor XIII werden in dem Abschnitt 5.5 diskutiert.

4.3.4 Synthese von inhibitorischen Peptiden

Nach den ersten Experimenten zur Kristallisation von FXIIIa (siehe Abschnitt 4.3.1) war klar, dass eine Aktivierung allein nicht ausreichend ist, um die aktive Konformation zu stabilisieren. Es wurden daher zwei verschiedenen Ansätzen nachgegangen. In den bisher beschriebenen Experimenten wurde ein am aktiven Zentrum irreversibel bindender Inhibitor zugesetzt (siehe Seite 54). Damit sollte die aktive Konformation stabilisiert und der Komplex kristallisiert werden. Parallel dazu wurden substratähnliche inhibitorische Peptide synthetisiert, welche während der Kristallisation im Überschuss zugegeben werden sollten. Bei erfolgreicher Kristallisation hätte eine Struktur mit derartigen Peptiden etwas über die Substratbindung aussagen können. Allerdings besteht aufgrund des derzeit fehlenden Wissens bezüglich der Substratbindung hierbei die Gefahr, dass die Peptide für eine stabile Bindung zu kurz sind. Andererseits dürfen diese Peptide auch nicht zu lang werden, da ungebundene, flexible Enden eine Kristallisation behindern könnten.

Als Vorlage diente das im Berichrom Assay verwendete Substratpeptid der Sequenz Gly-Ile-Val-Lys-Ser-Gln-Gly-Pro-Gly-Leu, welches für die Bindung an Faktor XIII bereits optimiert worden war [53]. Von dieser Sequenz ausgehend wurde das für die Transglutaminase-Reaktion essentielle Glutamin durch Alanin, Diaminobuttersäure, Norvalin bzw. ein Nitril²⁸ ersetzt (siehe Abb. 4.39). Die Alanin-Mutante sollte aufgrund der ansonsten unveränderten Sequenz binden, aber nicht reagieren. Falls für die Bindung des Substrats an Faktor XIIIa hydrophobe Wechselwirkungen mit der Seitenkette des Glutamins eine Rolle spielen, sollte Norvalin besser als Alanin für eine Substitution geeignet sein. Ist hingegen das polare Ende der Seitenkette für die Bindung an FXIIIa besonders wichtig, so müssten Diaminobuttersäure oder das Nitril das fehlende Glutamin am besten ersetzen. Ursprünglich war ein weiterer Ansatz mit einem zum Chlormethylketon umgewandeltem Glutamin (siehe Abb. 4.40) geplant, da sich diese Verbindungen als irreversible Serinproteasen-Inhibitoren bewährt haben. Weil das aktive Zentrum von Faktor XIII dem einer

²⁸Anstatt des systematischen Namens γ -Cyano- α -aminobuttersäure wurde diese Verbindung vereinfacht als Nitril bezeichnet, da diese Stoffgruppe alle organischen Verbindungen der Form R-CN umfasst.

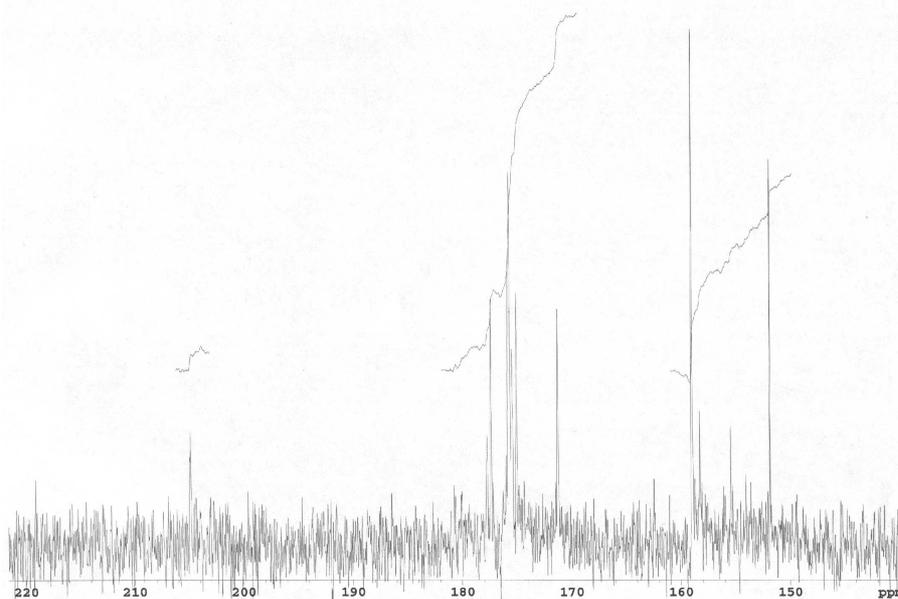


Abbildung 4.41: NMR-Spektrum des Syntheseendproduktes.

Cysteinprotease ähnlich ist, hätte eine gute Chance für eine kovalente Bindung am aktiven Zentrum bestanden. Leider schlug die Synthese aus unbekanntem Grund fehl. Die Ursache könnte eine Reaktion der Chlormethyl-Gruppe mit der Hauptkette und eine damit verbundene Ringbildung sein. Das Produkt der Synthese wurde mittels NMR und MS analysiert, wobei beide Methoden ein negatives Ergebnis brachten. Am einfachsten ist der Nachweis eines vorhandenen Chlormethylketons mittels NMR, da der Carbonylkohlenstoff mit der Chlormethylgruppe ein charakteristisches Signal bei 200 ppm aufweist. Wie jedoch in Abbildung 4.41 zu sehen ist, war in diesem Bereich kein Signal messbar.

Zur Vereinfachung der Synthese wurden zunächst mit 0,6 g eines Fmoc-Amid-Harzes ein Pentapeptid der Sequenz Gly-Ile-Val-Lys-Ser synthetisiert. Dabei wurde eine Ausbeute von 90 % erzielt²⁹. Nach anschließendem Trocknen wurde die erhaltene Menge Harz mit gebundenem Peptid auf die vier Synthesen mit den verschiedenen Aminosäuren aufgeteilt. Dabei wurden 179 mg mit Peptid beladenes Harz für die Kopplung mit Alanin, je 182 mg für die Kopplung mit Norvalin bzw. Diaminobuttersäure und 205 mg für die Kopplung mit dem Nitril verwendet. Dass für die Nitril-Kopplung etwas mehr Harz als für die anderen Synthesen verwendet wurde, war beabsichtigt. Diese Aminosäure wurde von Dr. T. Steinmetzer synthetisiert und bereits für die Herstellung eines anderen Peptids in einem Syntheseautomaten verwendet. Dabei kam es zu einem starken Einbruch der Ausbeute, was wahrscheinlich auf unerwünschte Nebenreaktionen zurückzuführen ist und dazu führte, dass das gewünschte Produkt nach Abschluss der Synthese nicht extrahiert werden konnte. Aufgrund dieser Erfahrung wurde auch bei dieser Peptidsynthese mit Problemen bei der Kopplung gerechnet, was sich leider auch bestätigte.

In Abbildung 4.42 ist die anhand der gemessenen Fmoc-Menge berechnete Ausbeute gezeigt. Eindeutig ist der Einbruch in der Ausbeute nach Kopplung von Glcn zu erkennen. Dies bedeutet, dass nur eine geringe Menge Glcn an das harzgebundene Peptid gebunden werden konnte. Allerdings sollte die Menge an korrekt syn-

²⁹100 % entsprach der Fmoc-Menge, die bei der Aktivierung des Harzes frei wurde.

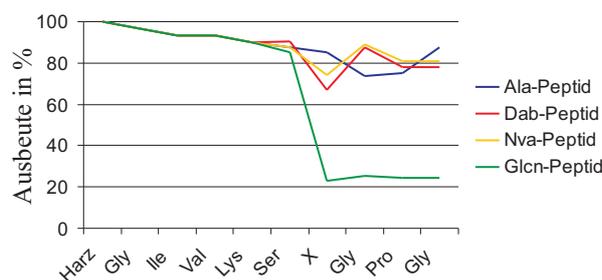


Abbildung 4.42: Ausbeuteabschätzung aufgrund der nach jeder Kopplung bestimmten Fmoc-Menge für das Ala-Peptid (blau), Dab-Peptid (rot), Nva-Peptid (gelb) und Glcn-Peptid (grün). Die Aufteilung in vier Ansätze erfolgte nach der Kopplung des Serins, aber noch vor der Fmoc-Abspaltung, weshalb sich die Kurven bis zu diesem Punkt überlagern.

Peptidname	IC ₅₀ -Wert
Ala-Peptid	183 mM
Nva-Peptid	> 1 M
Dab-Peptid	23 mM
GlcN-Peptid	2 mM

Tabelle 4.14: Auflistung der bestimmten IC₅₀-Werte.

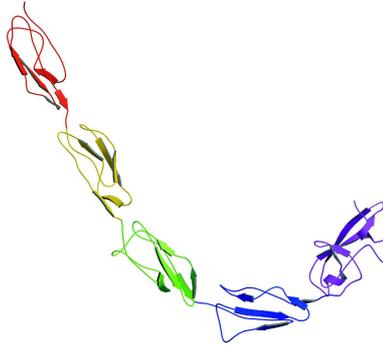
thetisierten Peptiden für einen Test und eventuelle Kokristallisation immer noch ausreichend sein.

Nach Abschluss der Synthese erfolgte eine Reinigung mittels HPLC, wie auf Seite 18 beschrieben ist. Danach wurde zur Identifizierung des gewünschten Produkts bzw. Überprüfung der erfolgreichen Synthese von allen Proben die Masse bestimmt (siehe Seite 18). Der letzte Schritt war das Lyophilisieren der Peptide, die dann als TFA-Salze bei 4 °C aufbewahrt wurden.

4.3.5 Überprüfung der inhibitorischen Wirkung der Peptide

Nach erfolgreicher Synthese und Reinigung der Peptide musste ihre Wirkung auf die Faktor XIII-Aktivität untersucht werden. In einem ersten Test mit dem Berichrom Assay zeigten die Peptide bei Konzentrationen von 1 bis 2 mM bis auf das Nitril keinen nennenswerten Einfluss auf die Faktor XIII-Aktivität. Damit die Ergebnisse aber besser mit der inhibitorischen Wirkung von Tridegin (siehe Seite 54) verglichen werden konnten, wurde die Bestimmung der IC₅₀-Werte unter identischen Bedingungen von Dr. Stöckel durchgeführt.

Leider zeigten die getesteten Peptide nicht die erhoffte Wirkung. Selbst der beste Inhibitor unter den synthetisierten Peptiden, das Nitril-Peptid, muss in einer Konzentration von 2 mM vorliegen, um die gemessene FXIII-Aktivität auf die Hälfte zu reduzieren! Zum Vergleich sei der mit dieser Methode bestimmte IC₅₀ von Tridegin genannt, der immerhin bei ca. 2,3 μM und damit um einen Faktor 1000 niedriger liegt. Mögliche Gründe für diese große Diskrepanz werden in Abschnitt 5.4 diskutiert.

Abbildung 4.43: Struktur von β_2 -Glycoprotein I.

4.4 Versuch der Kristallisation des Plasmafaktor XIII

Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass auch die im Blutplasma anzutreffende Form des Faktor XIII versucht wurde, zu kristallisieren. Dieses A_2B_2 -Heterotetramer besitzt zusätzlich zu dem bekannten Dimer zwei weitere Peptidketten, deren Struktur bisher unbekannt ist. Wie bereits in der Einleitung (Abschnitt 1.3) erwähnt wurde, kann man anhand der Aminosäuresequenz davon ausgehen, dass es sich um 10 GP-I-Domänen handelt. Eine Struktur der B-Untereinheit ist zwar nicht bekannt, allerdings existiert von dem für die Domänen namensgebenden Protein eine Struktur, dem β_2 -Glycoprotein I [88, 89]. Dieses 50 kDa schwere Protein umfasst 326 Aminosäuren, die 5 Domänen bilden. Somit ist β_2 -Glycoprotein I nur ungefähr halb so groß wie die B-Untereinheit des Plasmafaktor XIII (FXIII_B). Es besitzt 5 Glycosylierungsstellen, wobei sich allein vier davon in Domäne III befinden.

Anhand der Aminosäuresequenz ist eine starke Ähnlichkeit zu Teilen von FXIII_B auszumachen (siehe Abb. 7.3 im Anhang). Aus diesem Grund kann man bei beiden Proteinen eine ähnliche dreidimensionale Struktur erwarten. Die Abbildung 4.43 zeigt die Struktur von β_2 -Glycoprotein I.³⁰ Die einzelnen Domänen sind in unterschiedlichen Farben dargestellt, wobei die N-terminal gelegene Domäne rot und die C-terminale Domäne violett markiert wurden. Wie bereits für FXIII_B prognostiziert, bilden die Domänen eine Kette, die zu einem lang gestreckten Proteinmolekül führen. Im Falle von Faktor XIII wird deshalb spekuliert, dass sich die beiden B-Untereinheiten um das Dimer aus A-Untereinheiten legen. Für eine Bestätigung dieser These bedarf es aber der Struktur.

Zur Strukturaufklärung wurden verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet, die schließlich zu reproduzierbaren, nadelförmigen Kristallen bei Verwendung von 5% PEG 6000, 1 mM EDTA, 2 bis 6% Dioxan und 1 M Tris-HCl pH 8,0 führten. Es konnten in Abhängigkeit vom Dioxan-Gehalt Kugeln aus vielen Nadeln (Abb. 4.44) bzw. Nadelbündel (Abb. 4.45) erzeugt werden. Dabei erreichten die kugelförmigen Gebilde einen Durchmesser von bis zu 200 μm , während die Nadelbündel nur ca. 50 μm lang und weniger als 10 μm dick waren. Trotz intensiver Versuche gelang es nicht, Form und Größe so zu verbessern, dass ein verwertbarer Kristall entstanden wäre.

³⁰Die Struktur entspricht der in der PDB-Datei 1QUB angegebenen Topologie. Diese stimmt jedoch nicht mit dem in [88] dargestellten Topologiediagramm überein.

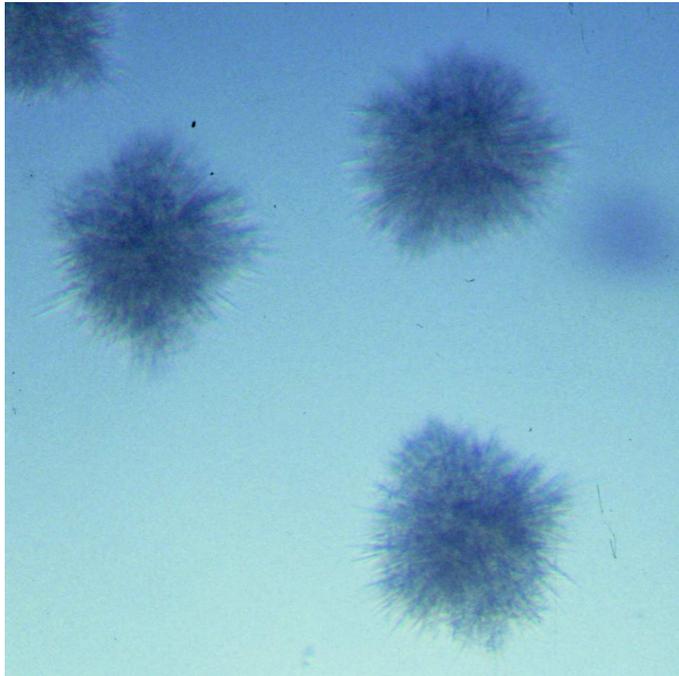


Abbildung 4.44: Kristalle von pFXIII bei 2 % Dioxan.

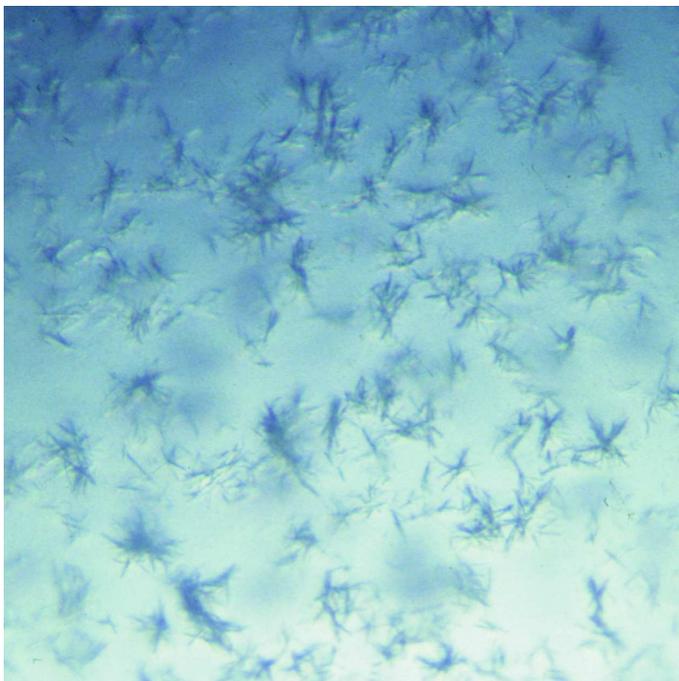


Abbildung 4.45: Kristalle von pFXIII bei 6 % Dioxan.

Kapitel 5

Diskussion

5.1 Strukturelle Unterschiede zu den bisher bekannten FXIII-Strukturen

Von den 5 in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen kann man für die monokline Strukturen mit und ohne Calcium, sowie für die orthorhombische Struktur entsprechende Einträge in der Struktur-Datenbank finden. Die Tabelle 5.1 soll einen Überblick über einige wichtige Parameter dieser Strukturen vermitteln. In allen Fällen weisen die neuen Strukturen die höhere Auflösung und in 2 von 3 Fällen auch die deutlich besseren R-Faktoren auf. Zur Beurteilung der Vollständigkeit der Struktur ist sowohl die Anzahl der fehlenden Aminosäuren als auch die Anzahl der Aminosäuren mit Torsionswinkeln im verbotenen bzw. großzügig erlaubten Bereich aufgelistet. Schließlich kann man auch Aminosäuren in die Struktur einbauen, die nur sehr schlecht in der Elektronendichte definiert sind, welche aber überdurchschnittlich oft ungewöhnliche Torsionswinkel aufweisen. Dabei muss man allerdings anmerken, dass es noch andere Ursachen hierfür gibt. So besitzen auch Aminosäuren in Kehren und Biegungen häufig auffällige Torsionswinkel. Betrachtet man die in Tabelle 5.1 aufgelisteten Parameter, so kann man insgesamt ohne Übertreibung von einem deutlichen Fortschritt bei der Strukturbestimmung des Faktor XIII sprechen.

Vergleicht man die dreidimensionale Strukturen der in der Datenbank hinterlegten und den in dieser Arbeit vorgestellten FXIII-Strukturen, so ergeben sich

	FXIII _m	1F13	FXIII _{mca}	1EVU	FXIII _o	1GGT
Auflösung in Å	1,95	2,10	1,60	2,01	2,40	2,65
R-Faktor	0,154	0,183	0,174	0,208	0,225	0,216
freier R-Faktor	0,195	0,236	0,197	0,266	0,287	- ^a
fehlende Aminosäuren	24	21	4	47	40	44
Aminosäuren mit anormalen Torsionswinkeln ^b	8	17	14	11	22	29
Anzahl der Wassermoleküle	1 448	487	1 394	1 415	353	0

Tabelle 5.1: Vergleich der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen mit den entsprechenden in der PDB-Datenbank bereits enthaltenen FXIII-Strukturen.

^anicht angegeben

^blaut Ramachandran-Plot

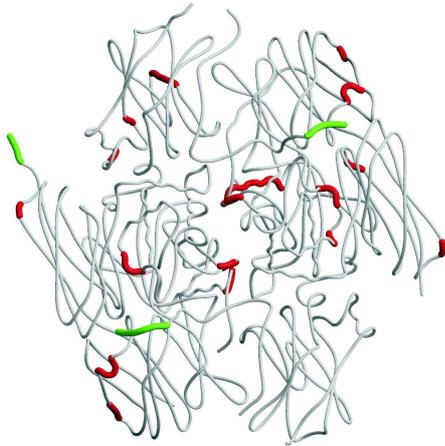


Abbildung 5.1: Sekundärstrukturvergleich der neuen FXIII-Struktur (FXIIIIm) mit der bisher bekannten FXIII-Struktur (PDB-Code 1F13), wobei die Unterschiede rot und die zusätzlichen Bereiche grün markiert sind.

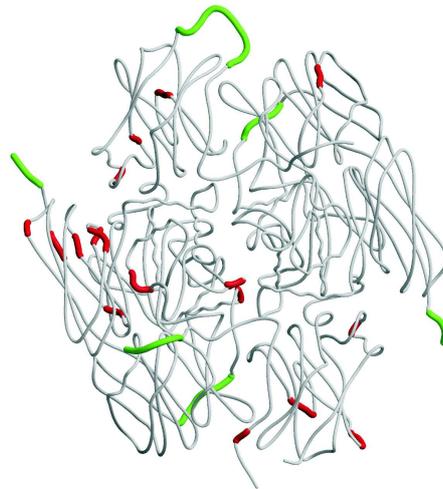


Abbildung 5.2: Vergleich der 1,6 Å-Struktur (FXIIIImca) mit der entsprechenden Struktur aus der Datenbank (PDB-Code 1EVU). Die Unterschiede in der Sekundärstruktur sind rot und die zusätzlichen Bereiche grün markiert.

auf den ersten Blick keine gravierenden Unterschiede. Das ist auch nicht weiter verwunderlich, da lediglich die Auflösung und die Qualität erhöht wurde. Zur Verdeutlichung dieser Aussage sei ein folgendes Beispiel aufgeführt: Fotografiert man ein bestimmtes Motiv zuerst mit einer billigen Digitalkamera und anschließend mit einer Profi-Digitalkamera, ist das Motiv auf beider Bildern identisch. Die Feinheiten sind aber nur auf einem Foto gut zu erkennen. So sind auch die Differenzen zwischen den FXIII-Strukturen eher in Kleinigkeiten sichtbar. Ein Beispiel dafür ist die Sekundärstruktur. Vergleicht man die genaueste Struktur des nativen Faktor XIII (PDB-Code 1F13) mit der in Abschnitt 4.1.1 vorgestellten Struktur (FXIIIIm) so finden sich zahlreiche kleine Abweichungen. In der Regel sind dies um eine oder zwei Aminosäuren verkürzte oder gar verlängerte β -Stränge und α -Helices. Ein prominentes Beispiel dafür ist die mit dem aktiven Zentrum (Cys314) beginnende α -Helix. Bisher konnte man stets lesen, dass diese Helix aus 17 Resten gebildet wird. Offensichtlich umfasst diese Helix nur 15 Aminosäuren. Es konnten aber auch einige neue 3_{10} -Helices gefunden werden, wie z. B. von A289 bis A291. Eine Darstellung aller Differenzen ist in Abb. 5.1 zu finden¹. Des Weiteren erlaubt die höhere Auflösung erstmals eindeutige Unterschiede zwischen der beiden Monomeren zu definieren. Interessant ist hierbei, dass in allen Strukturen der letzte β -Strang in einem Monomer bereits an Position 715 beginnt, während im Nachbarmonomer Aminosäure 717 den Anfang markiert. Eine strukturelle Ursache dafür ist nicht auszumachen. Möglicherweise besteht aber ein Zusammenhang mit der Tatsache, dass es stets mehr Kontakte zwischen den N-terminalen Resten der A-Kette mit den C-terminalen Resten der B-Kette gibt als umgekehrt.

Etwas überraschend ist die Tatsache, dass sich die beiden Strukturen FXIIIIm

¹Die in Abb. 5.1 dargestellten Differenzen beziehen sich nur auf die mit dem Programm DSSP gefundenen Unterschiede. Vergleicht man hingegen die Sekundärstruktur von FXIIIIm mit der in der PDB-Datei (1F13) enthaltenen Sekundärstruktur, welche manuell bearbeitet worden ist, kann man 125 Unterschiede finden.

	FXIII _m	1F13	FXIII _{mca}	1EVU
FXIII _m	-	0,603	0,272	0,550
1F13		-	0,738	0,713
FXIII _{mca}			-	0,633

Tabelle 5.2: Auflistung der mittleren quadratischen Abweichungen der Atomkoordinaten in Å bestimmt mit LSQKAB

und FXIII_{mca} in Bezug auf die mittlere Abweichung der Atomkoordinaten ähnlicher sind, als wenn man diese Strukturen mit den jeweiligen Strukturen aus der Datenbank 1F13 und 1EVU vergleicht. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 5.2 aufgelistet. Anhand dieser Werte ist müsste der Effekt der Calcium-Bindung geringer sein, als die Unterschiede zwischen zwei verschiedenen FXIII-Kristallen. Wahrscheinlich sieht man aber hier den Einfluss der unterschiedlichen Verfeinerungsprogramme, die im Zuge der Strukturbestimmung verwendet worden. Dies zeigt, wie wichtig es war ein möglichst identisches Protokoll bei der Strukturverfeinerung aller FXIII-Strukturen einzuhalten. Nur so kann man am Ende wirkliche Unterschiede zwischen den Strukturen versuchen zu finden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Calcium-Bindung. Wie bereits in Abbildung 1.6 auf Seite 12 zu sehen ist, existiert bereits eine Beschreibung des an Faktor XIII gebundenen Calciumions mit einigen Liganden. Die genaueste Struktur ist unter dem PDB-Code 1EVU in der Datenbank hinterlegt. Aber erst der bei 1,6 Å bestimmte Komplex mit Calcium (FXIII_{mca}) ermöglichte die genaue Ortsbestimmung aller beteiligten Liganden (Abb. 4.6, Seite 4.6). Die in beiden Strukturen gefundenen Liganden befinden sich an fast identischen Positionen. Die Unterschiede betragen nur wenige Zehntel Ångström. In Tabelle 5.3 sind die Calcium-Liganden der beiden Strukturen paarweise aufgelistet und deren Abstände zum Calciumion angegeben.

Im Gegensatz zu der bereits bekannten Struktur, ist die Anordnung der Calciumliganden in der FXIII_{mca}-Struktur nicht in beiden Untereinheiten identisch. Die Abbildung 5.3 soll dies illustrieren. Dafür wurden die an der Bindung des Calcium beteiligten Liganden überlagert und zur besseren Unterscheidung die Liganden aus der A-Untereinheit hellgrau und alle anderen dunkelgrau gezeichnet. Deutlich zu sehen ist, dass die Position eines Wasser-Liganden, es handelt sich um W4 im A- bzw. W10 im B-Monomer, um 2,60 Å verschoben ist. Während sich W4 zwischen der Ammoniumgruppe von Lys482 der Carboxylgruppe von Glu490 (beide zur besseren Übersicht nicht der Abbildung eingezeichnet) befindet, bildet W10 zusammen mit W7–W11 ein fast planares Fünfeck. Bei allen anderen Liganden verändert sich deren Lage bis auf das Paar W5 und W11, bei denen sich eine Differenz von 0,8 Å ergibt, nur um 0,2–0,3 Å. Eine Ursache für die Verschiebung von W10 relativ zu W4 ist nicht auszumachen. Fast die gesamte Umgebung ist in beiden Monomeren konserviert. Nur im Falle von Glu485 ist eine eindeutige Veränderung zu erkennen. So verschiebt sich das α -Kohlenstoffatom um 0,9 Å und auch die Kon-

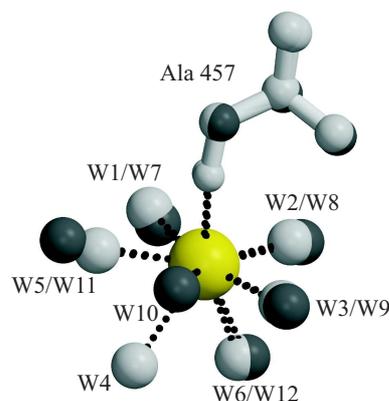


Abbildung 5.3: Überlagerung der Ca^{2+} -Liganden-Positionen

Liganden in der A-Untereinheit			
FXIII _{mca}		1EVU	
Ligand	Abstand in Å	Ligand	Abstand in Å
Ala457A O	2,33	Ala457A O	2,61
W1	2,40	599	2,65
W2	2,31	407	2,68
W3	2,38	624	2,76
W4	2,80	626	2,62
W5	2,32	—	—
W6	2,52	326	2,80
Liganden in der B-Untereinheit			
Ala457B O	2,39	Ala457B O	2,48
W7	2,32	343	2,58
W8	2,62	112	2,64
W9	2,62	460	2,79
W10	2,80	—	—
W11	3,13	528	3,17
W12	2,58	162	2,73

Tabelle 5.3: Ligandenabstände in den beiden FXIII-Strukturen mit Calcium

formation der Seitenkette ändert sich etwas. Als Folge dessen existiert eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Sauerstoffatom der Carboxylgruppe und W10 (Abstand 2,54 Å). Allerdings sprechen zwei Dinge dagegen, dass dies einen Einfluss auf die Positionsänderung des Calciumliganden W10 haben sollte. Erstens wäre auch in dem A-Monomer Glu485 in der Lage durch eine kleine Rotation der Carboxylgruppe ein Akzeptor für eine Wasserstoffbrücke an fast identischer Position anzubieten. Des Weiteren ist die Elektronendichte speziell für die Seitenkette von Glu485, aber auch für den gesamten Bereich dieser Aminosäure nicht besonders gut. So ist z. B. für die in einer Schlaufe an der Oberfläche des Proteins gelegene Aminosäure Gln487 fast keine ausreichende Elektronendichte vorhanden. Deshalb sollte man die Position von Glu490 und deren Seitenkettenkonformation nicht auf die Goldwaage legen. Somit kann leider keine Aussage über mögliche Ursachen der unterschiedlichen Ligandenanordnung in beiden Monomeren getroffen werden.

5.2 Vergleich der unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene Kristallisationsbedingungen für Faktor XIII vorgestellt.

1. 20 mM MES, pH 5,6 und 18 % Ammoniumsulfat
2. 10,5 % (w/v) Ammoniumacetat, pH 7,4
3. 100 mM MES, pH 6,2–6,5

Unter den ersten beiden Bedingungen wuchsen orthorhombische Kristalle², während bei der Verwendung von 100 mM MES, pH 6,2 bis 6,5 monokline Kristalle entstanden. Unter den letztgenannten Kristallisationsbedingungen entstanden größte-

²Es ist erwähnenswert, dass trotz erfolgreicher Kristallisation der unter 1. aufgeführten Bedingung keine daraus hervorgegangenen Kristalle zur Strukturbestimmung verwendet wurden.

re und gleichzeitig besser geordnete Kristalle, wie anhand der höher aufgelösten Strukturen zu sehen ist. Die genauen Ursachen dafür, warum die monoklinen Kristalle stets besser waren als die orthorhombischen Kristalle, sind nicht bekannt. Möglicherweise ist eine die fehlende Optimierung. Immerhin wurden die Kristallisationsbedingungen für die monokline Kristallform über mehrere Jahre verfeinert. An den orthorhombischen Kristallen wurde dagegen „nur“ einige Monate gearbeitet. Aber schon in der ersten Publikation über die Kristallisation von Faktor XIII in beiden Kristallformen waren die monoklinen Kristalle den orthorhombischen in punkto Streukraft überlegen [43]. Im Allgemeinen sind monokline Kristalle bedingt durch ihre Symmetrie besser geordnet als orthorhombische Kristalle — nicht nur im Falle von Faktor XIII.

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei der Gelakkupunkturmethode, bei der die gezüchteten Kristalle nur eine unterdurchschnittliche Größe erreichten. Mit etwas Optimierung wären sicherlich auch dort größere Kristalle möglich. Man muss allerdings feststellen, dass sich zumindest im Falle von Faktor XIII kein gravierender Unterschied zwischen den im Weltraum gewachsenen Kristallen und der entsprechenden Kontrolle auf der Erde feststellen lässt. Die gefundenen Unterschiede sind signifikant, allerdings beruhen sie für eine solide Statistik auf zu wenigen Kristallen. Die Wahrscheinlichkeit für ein deutlicheres Ergebnis bei der Betrachtung einer größeren Anzahl von Faktor XIII-Kristallen ist meiner Meinung nach gering. Dass es bei anderen Proteinen teilweise durchaus Verbesserungen der Kristallqualität gab, ist unbestritten. Ob aber dies die Regel ist und Faktor XIII eine Ausnahme, bleibt offen.

5.3 Vergleich der Faktor XIII-Strukturen

Beim Vergleich der orthorhombischen mit der monoklinen Kristallform fällt als erstes der Unterschied in der asymmetrischen Einheit auf. Während in den Strukturen der monoklinen Kristalle das biologische Dimer die kleinste Einheit darstellt³, fällt die zweizählige Achse zwischen den beiden Monomeren in der orthorhombischen Kristallform auf eine Symmetrieachse. Deshalb bildet in diesen Kristallen ein nicht-biologisches Dimer die asymmetrische Einheit, wie in Abb. 5.4 zu sehen ist. Als bereits bekanntes Bild zeigt Abb. 5.4a den Inhalt der asymmetrischen Einheit in den monoklinen Kristallen, wobei die rechte Darstellung der Ansicht des linken Bildes von der rechten Seite betrachtet entspricht. Die gleichen Ansichten des Dimers in der asymmetrischen Einheit sind in Abb. 5.4b zu sehen — allerdings von der orthorhombischen Kristallform. Deutlich erkennbar ist hierbei der fehlende C-Terminus an Domäne 4 (blau) und die Schlaufe, welche Aktivierungspeptid (schwarz) und Domäne 1 (gelb) verbindet.

Berechnet man die Kontaktfläche zwischen den verschiedenen Arten von Dimeren, so zeigt sich eindeutig, dass das in den orthorhombischen Strukturen definierte Dimer nicht das bevorzugte Dimer sein kann. So bemisst die Kontaktfläche in der monoklinen Kristallform 3062 \AA^2 , was 9,6 % der gesamten Oberfläche entspricht⁴. Im Dimer der orthorhombischen Kristalle hingegen beträgt dieser Wert nur 470 \AA^2 (1,6 %).

5.3.1 Kristallpackung

Eine Frage, die vor allem Nichtkristallographen stellen, ist der Einfluss der Kristallkontakte auf die Struktur. Schon immer wurden Kristallstrukturen aufgrund der

³Eine Ausnahme bildet hierbei die Kristallform mit der verdoppelten c-Achse. In diesem Fall bilden zwei Dimere die kleinste Einheit.

⁴Diese Werte wurden mit dem Programm SURFACE [90, 91] berechnet.

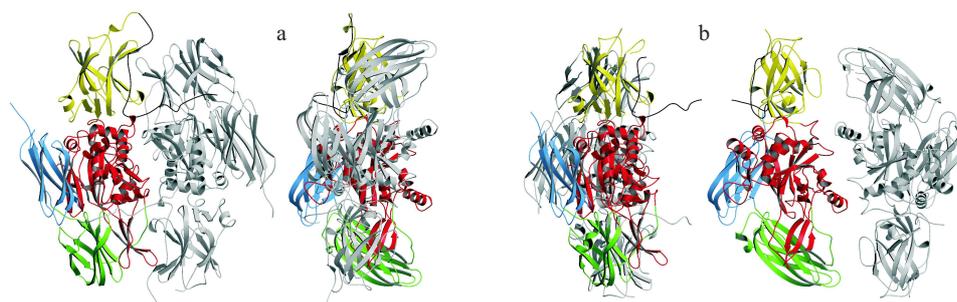


Abbildung 5.4: Vergleich der unterschiedlichen Dimere in der asymmetrischen Einheit der monoklinen (5.1a), bzw. orthorhombischen (5.1b) Struktur in jeweils zwei verschiedenen Orientierungen. Die farbig dargestellte Untereinheit ist in a und b gleich ausgerichtet.

dichten Packung der Proteinmoleküle und der daraus resultierenden, zahlreichen Kristallkontakte verdächtigt, die „biologische Struktur“ nur verfälscht wiederzugeben. Glücklicherweise ist nach zahlreichen Vergleichen mit NMR-Strukturen und der Korrelation von strukturbiochemischen und biochemischen Daten die Diskussion darüber verstummt und sind hoffentlich die letzten Zweifler eines Besseren belehrt. Das Problem der Kristallkontakte hat jedoch sehr wohl eine Bedeutung bei der Analyse der Beweglichkeit der Struktur. Wird eine Domäne durch viele Kontakte mit Nachbarmolekülen in ihrer Beweglichkeit stark eingeschränkt, kann man sie nicht ohne weiteres mit einer nur von Wasser umgebenen Domäne vergleichen.

Zunächst soll anhand der Abbildung 5.5 der Unterschied zwischen der Anordnung der Moleküle in den monoklinen und den orthorhombischen Kristallen verdeutlicht werden. Es ist jeweils der Inhalt der asymmetrischen Einheit bzw. der Einheitszelle (rot) mit allen Symmetrienachbarn in der *ab*-Ebene (schwarz) dargestellt. In der monoklinen Raumgruppe sind das Dimer und die Anordnung der zweiten Schicht, welche aufgrund der zweizähligen Schraubenachse um 90° rotiert und um eine halbe Achsenlänge entlang der *c*-Achse verschoben ist⁵, gut zu erkennen. Da in $P2_1$ die asymmetrische Einheit einer halben Einheitszelle entspricht, ist in Abb. 5.5b ein zweites Dimer zu erkennen. Im Gegensatz dazu beschreibt in $P2_12_12$ die asymmetrische Einheit nur ein Viertel der Einheitszelle, was in Abb. 5.5d eindeutig zu sehen ist. Das biologische Dimer ist in der orthorhombischen FXIII-Struktur nicht in der asymmetrischen Einheit enthalten, sondern wie bereits besprochen über die Symmetrieelemente definiert. Dies ist in Abb. 5.5d recht gut zu sehen. Bei einem direkten Vergleich der Abb. 5.5b mit Abb. 5.5d zeigt die etwas dichtere Packung der Moleküle in der orthorhombischen Kristallform. Das bestätigt auch die entsprechenden Matthews-Parameter, der im Falle der monoklinen Kristallform $2,83 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ und bei der orthorhombischen Kristallform $2,61 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ beträgt⁶. Es bleibt anzumerken, dass die beiden in der asymmetrischen Einheit enthaltenen FXIII-Monomere in der Abb. 5.5c hintereinander liegen, was sich in den beiden, wie Antennen abstehenden Aktivierungspeptiden bemerkbar macht.

Es dürfte jedem Betrachter der Abbildung 5.5 sofort auffallen, dass sich die Anordnung der Proteinmoleküle in den verschiedenen Kristallformen grundlegend unterscheidet. Dies zeigt sich auch bei den Kristallkontakten. In Abb. 5.6 sind die einzelnen Wasserstoffbrückenbindungen und Salzbrücken zwischen den in der asymmetrischen Einheit enthaltenen Dimeren in der monoklinen und der orthorhombischen Kristallform und den benachbarten FXIII-Molekülen verdeutlicht. Dabei sind

⁵Die äquivalenten Positionen in $P2_1$ sind x, y, z und $-x, y + \frac{1}{2}, -z$

⁶Dies entspricht einem Wassergehalt von 56,12 % bzw. 52,43 %.

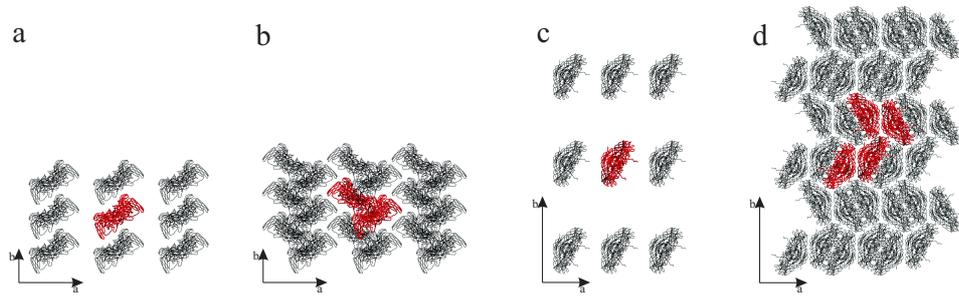


Abbildung 5.5: Vergleich der Kristallpackung in der ab-Ebene in der monoklinen (a und b) bzw. der orthorhombischen Kristallform (c und d). Rot wurden in a und c der Inhalt der asymmetrischen Einheit und in b und d der Inhalt der Einheitszelle markiert.

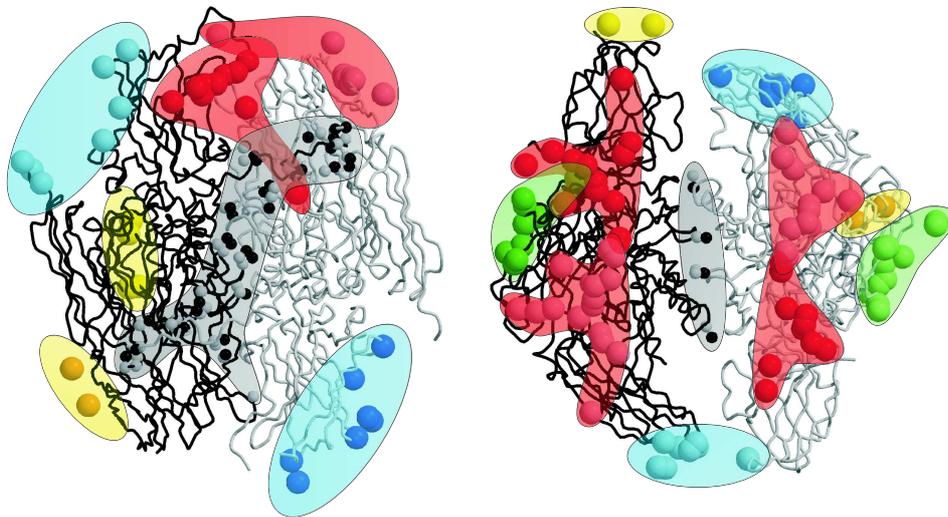


Abbildung 5.6: Kristallkontakte des FXIII-Dimers in der monoklinen (links), bzw. der orthorhombischen Raumgruppe (rechts), wobei von der Proteinstruktur zur besseren Übersicht nur das $C\alpha$ -Rückgrat dargestellt ist. Nähere Erläuterungen zu den verwendeten Farben siehe Text.

die an den Kontakten beteiligten Atome als Kugeln dargestellt und alle Kontakte zwischen zwei bestimmten Monomeren farblich zusammengefasst. So sind z. B. die intramolekularen Wasserstoff- und Salzbrücken mit hellgrauen und schwarzen Kugeln markiert. Hellgrau sind alle im linken und schwarz alle im rechten Monomer beteiligten Atome abgebildet. Um diese Markierungen deutlich von allen anderen abzugrenzen, wurde die so abgegrenzte Kontaktfläche grau hinterlegt. Ähnlich verhält es sich mit den anderen Kontakten, wobei die Farben die Zuordnung der zueinander gehörenden Kontakte erleichtern soll. So bilden Gelb mit Orange, Dunkelgrün mit Hellgrün, Rot mit Rosa, sowie Hellblau mit Dunkelblau komplementäre Kontaktflächen.

Was bereits anhand der Größe der Kontaktflächen bewiesen werden konnte, zeigt sich auch bei der Betrachtung der Kristallkontakte. Das in der asymmetrischen Einheit der orthorhombischen Kristalle enthaltene Dimer ist nur ein Artefakt. Zwischen den beiden Monomeren existieren nur 4 Kontakte, die in Abb. 5.6 mit schwarzen und hellgrauen Kugeln markiert sind. Im Gegensatz dazu gibt es mit dem Nach-

barmonomer, mit welchem das natürliche Dimer gebildet wird, mehr als 30 direkte Kontakte (rosa und rot gefärbte Kugeln).

Aus der Abbildung geht auch hervor, dass in der orthorhombischen Kristallform das Dimer in der asymmetrischen Einheit mehr Kontakte zu Nachbardimeren aufweist und auch mit mehr Nachbarmolekülen in Kontakt steht. Diese Aussage entspricht den Erwartungen, wenn man bedenkt, dass diese Kristallform dichter gepackt ist als die monokline.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Tatsache, dass im Gegensatz zu der monoklinen Struktur alle Domänen in der orthorhombischen Kristallstruktur über Kristallkontakte fixiert werden. Deutlich wird dieser Umstand beim Betrachten von Domäne 4 der B-Untereinheit. Diese weist in der monoklinen Kristallform nur 2 Kontakte mit Nachbarmolekülen auf. Im Gegensatz dazu sind es in der orthorhombischen Kristallform 9, wobei es sich in 5 Fällen sogar um Salzbrücken handelt. Da auch in diesem Fall ein Anstieg der Temperaturfaktoren und damit der Beweglichkeit der C-terminalen Domänen zu beobachten ist, muss die Ursache dafür im Proteinmolekül liegen. Grundsätzlich besitzt die A-Untereinheit in der monoklinen Kristallform deutlich mehr Wasserstoff- und Salzbrücken als die B-Untereinheit, während das Verhältnis in der orthorhombischen Kristallform etwa ausgeglichen ist. Diese Tatsache schlägt sich auch in der Flexibilität der beiden Untereinheiten nieder. In der monoklinen Kristallform führen die Unterschiede zwischen den beiden Monomeren in Bezug auf die Anzahl der Kristallkontakte zu einem um rund 20 % höheren durchschnittlichen Temperaturfaktor der B-Kette relativ zur A-Kette. In der orthorhombischen Kristallform hingegen sind beide Proteinketten gleich gut im Kristallgitter verankert und deshalb auch kein signifikanter Unterschied im durchschnittlichen Temperaturfaktor festzustellen.

5.3.2 Analyse der Domänen-Beweglichkeit

Wenn man die Domänenbeweglichkeit auf Basis der TLS-Parameter vergleicht, muss man sich auch damit beschäftigen, wie groß die Aussagekraft dieser Werte ist. Die TLS-Parameter wurden kurz vor dem Abschluss der Verfeinerung mit den verfeinerten atomaren Temperaturfaktoren ermittelt. Bei der in [92] empfohlenen Prozedur werden aber die atomaren Temperaturfaktoren zur Bestimmung der TLS-Parameter auf einen bestimmten Wert fixiert. Im besagten Fall waren es 20 \AA^2 . Dieses Vorgehen ist auch verständlich, da bei der Methode zunächst die gemeinsame Bewegung der Atome ermittelt werden soll und erst danach die Bewegung der einzelnen Atome betrachtet wird. Allerdings führte ein Test mit der $1,6 \text{ \AA}$ -Struktur mit dieser Prozedur zu einem um 0,7 % höheren R- und einem um 1,1 % höheren freien R-Faktor, höheren Temperaturfaktoren und deutlich größeren Werten für den L-Tensor in den einzelnen TLS-Gruppen, während sich bei T- und S-Tensor nur geringe Differenzen ergaben. In Anbetracht der Tatsache, dass vor allem der freie R-Faktor bei den durch eine Fixierung der Temperaturfaktoren ermittelten TLS-Parameter deutlich höher lag und das Verfeinerungsergebnis damit offensichtlich weniger gut die „wahre“ Struktur beschreibt, wurden diese nicht in der Auswertung berücksichtigt. Etwas irritierend ist es aber schon, wenn kleine Änderungen im Verfeinerungsprotokoll zu solchen Unterschieden in den TLS-Parametern führen. Das bestätigt den Hinweis der Autoren der TLS-Verfeinerung, die die TLS-Parameter mehr als Indiz denn als Beweis verstanden haben wollen. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchung Tendenzen auf, sollten aber nicht als unverrückbare Fakten aufgefasst werden.

Aufgrund der bekannten Struktur war es relativ einfach, die TLS-Gruppen auf Basis der einzelnen Domänen zu bilden. Prinzipiell gibt es von der Methode her bei der Festlegung der Größe dieser Gruppen keine Einschränkungen. Nur das Zusammenfassen einer zu kleinen Anzahl von Atomen, z. B. einer einzelnen Aminosäure, kann zu Komplikationen führen. Interessanterweise zeigen sich sogar dann positive

Effekte auf die R-Faktoren, wenn der gesamte Inhalt der asymmetrischen Einheit zu einer einzigen TLS-Gruppe zusammengefasst wird [92].

Zunächst muss natürlich geklärt werden, inwieweit die TLS-Parameter überhaupt Informationen über Domänenbewegungen liefern können. Grundsätzlich dienen diese Parameter der besseren Interpretation der gemessenen Daten. In der Praxis bedeutet das eine bessere Anpassung des Strukturmodells an die berechnete Elektronendichte. Dies beinhaltet aber auch, dass die TLS-Parameter nur bei sehr genau gemessenen Daten ein realistisches Bild der Domänenbewegungen liefern. Im Falle der FXIII-Strukturen bedeutet es, dass z. B. die TLS-Parameter der 1,6 Å-Struktur (monoklin, mit Calcium) aussagekräftiger sind, als die der 2,7 Å-Struktur (orthorhombisch, mit Calcium). Trotzdem sollte es auch im letztgenannten Fall möglich sein, eine sehr bewegliche Domäne von einer unbeweglichen zu unterscheiden.

Bevor die TLS-Parameter nun analysiert werden, sollte zuerst geklärt werden, warum sich die einzelnen Domänen überhaupt bewegen können und in welcher Art und Weise dies zu erwarten ist. Betrachtet man sich die Struktur des Faktor XIII, so sind die ersten drei Domänen wie Perlen in einer Perlenkette hintereinander angeordnet. Nur das dreisträngige β -Blatt, welches aus Domäne 2 in Richtung Domäne 3 herausragt, stört ein wenig dieses Bild (siehe dazu Seite 1.3.4). Die vierte Domäne schließlich ist nicht mehr in einer Reihe mit den anderen und kontaktiert die Domänen 2 und 3. Ähnlich wie bei einer Perlenkette, können auch hier die Domänen ihre relative Position zueinander in gewissen Grenzen verändern. Hinzu kommt, dass die stabilisierenden Fixpunkte, in diesem Fall die Kontakte untereinander, von ihren Eigenschaften her eher mit Magneten oder Stahlfedern zu vergleichen sind. Somit sind auch hier Verschiebungen möglich. Bezogen auf Faktor XIII bedeutet dies, dass die Kerndomäne mit Sicherheit die unbeweglichste Domäne ist. Sie steht in Kontakt mit allen anderen Domänen und bildet zusätzlich das Zentrum des Dimers. Nur eine eingeschränkte Beweglichkeit ist von Domäne 1 zu erwarten. Sie ist nicht nur durch das Aktivierungspeptid und Domäne 2 recht gut fixiert, sondern weist auch zahlreiche Kistallkontakte zu Nachbarproteinen auf (siehe Abb. 5.6). Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Domäne 3. Auch hier gibt es Kontakt mit Nachbarmolekülen und vor allem mit dem Aktivierungspeptid des anderen Monomers. Bei Domäne 4 dagegen ist schon anhand der Struktur vorhersagbar, dass dies die flexibelste Domäne sein wird. Und da diese Beweglichkeit sich auch auf Domäne 3 auswirken wird, sollte sich Domäne 3 etwas stärker bewegen als Domäne 1. Insgesamt ist auch ein Unterschied zwischen den beiden Monomeren in der monoklinen Kristallform zu erwarten, da hier bekanntlich die Anzahl der Kristallkontakte asymmetrisch verteilt sind.

Soweit zur Theorie — aber was ergab die Praxis? Nach der Verfeinerung der TLS-Parameter ergab sich für jede Gruppe ein Satz von 20 TLS-Parametern und die Koordinaten eines festen Bezugspunkts. Nachfolgend sind als ein Beispiel die TLS-Parameter der Domäne 2 der nativen, monoklinen Struktur aufgelistet.

T	0.1163	0.0970	0.1553	0.0031	-0.0001	-0.0063		
L	0.2770	0.1405	0.3798	0.1924	-0.1111	-0.1323		
S	0.0325	-0.0560	-0.0055	-0.0677	-0.0127	-0.0152	-0.0210	0.0513

Es ist typisch für die TLS-Parameter der verschiedenen FXIII-Strukturen, dass in der Regel der L-Term, welcher eine Bewegung in Form einer Oszillation beschreibt, am größten ist. Dies zeigt sich auch eindeutig in der grafischen Auswertung der Parameter mit dem Programm TLSANAL. In Abb. 5.7 sind die TLS-Parameter der beiden monoklinen Strukturen mit und ohne Calcium dargestellt. Dieses Paar wurde ausgewählt, weil das die beiden Strukturen mit der höchsten Auflösung sind und bereits erwähnt wurde, dass die Aussagekraft der TLS-Parameter eindeutig von

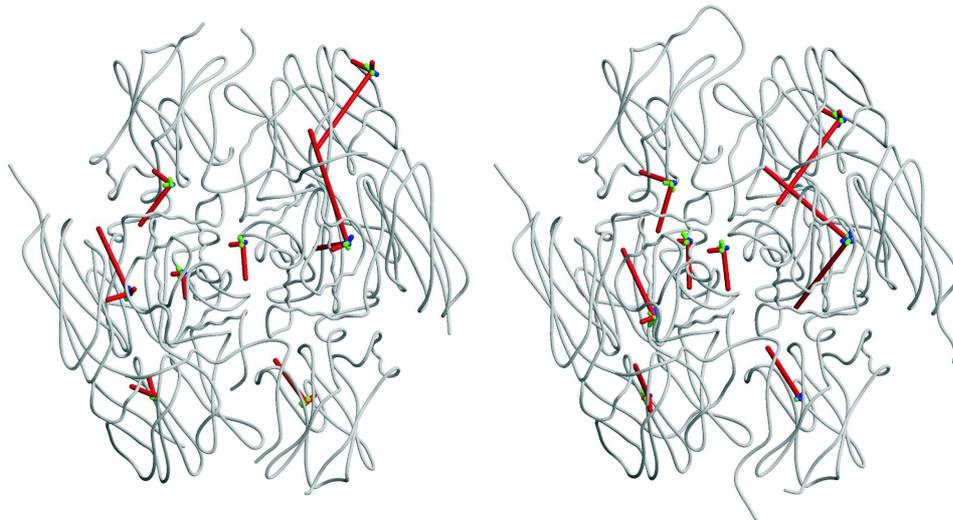


Abbildung 5.7: Die mit TLSANAL erzeugte grafische Darstellung der TLS-Parameter. Als Beispiel sind die monokline Strukturen in der nativen (links) und der Calcium-enthaltenden Form (rechts) aufgeführt. Der T-Term ist blau, der L-Term rot und der S-Term grün abgebildet.

der Güte der Struktur abhängig ist. Es sind fast ausschließlich die rot abgebildeten Achsen der verschiedenen L-Terme zu sehen. Die einzelnen Achsen stellen dabei die Rotationsachsen dar, um die die jeweilige Domäne oszilliert. Dabei korreliert die Länge einer Achse mit dem entsprechenden Rotationswinkel.

Grundsätzlich bestätigen die TLS-Parameter die Vorhersagen: Die beiden in der asymmetrischen Einheit befindlichen Monomere unterscheiden sich signifikant in ihrer Beweglichkeit, wobei sich das B-Monomer stärker bewegt. Wie erwartet bildet die Kerndomäne eine Art Ruhepunkt. Von den anderen drei Domänen bewegt sich Domäne 1 etwas, Domäne 3 schon recht deutlich und Domäne 4 am stärksten von allen. Die TLS-Parameter ermöglichen aber auch eine genaue räumliche Auflösung dieser Bewegungen. Dabei ist in Abb. 5.7 gut zu sehen, wie sich die Schwingungsrichtung von Domäne 4 in dem B-Monomer durch die Calcium-Bindung deutlich ändert. Veränderungen in Bewegungsrichtung und Intensität sollten ihre Ursachen stets in Strukturänderungen und Differenzen bei den stabilisierenden Kontakten haben. Beides kann aber im vorliegenden Fall nicht bestätigt werden. Das gebundene Calciumion liegt weit von Domäne 4 entfernt und eine signifikante Änderung in der Struktur ist auch nicht zu beobachten. Andererseits ist eine Abweichung in der Schingungsrichtung dahingehend interessant, als dass sich an der Kontaktfläche zwischen Domäne 4 und Domäne 2 eine nicht unbedeutende Schlaufe befindet. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 5.8 dieser Teil der Struktur vergrößert dargestellt. Dabei entsprechen die Farben der Domänen den bisher verwendeten Farben, wie z. B. in Abb. 5.4. Allerdings ist in Domäne 2 nur der Bereich von Gly277 bis Val296 rot und das aktive Zentrum mit einer gelben Kugel markiert. Die Schlaufe, die genau genommen aus zwei Schlaufen und einer 3_{10} -Helix besteht, bedeckt das aktive Zentrum

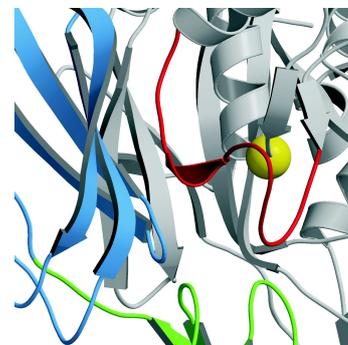


Abbildung 5.8: Die das aktive Zentrum verdeckende Schlaufe

und müsste in Folge der Aktivierung ihre Lage ändern, damit das Substrat freien Zugang zum Cystein im aktiven Zentrum hat. Änderungen in der Beweglichkeit von Domäne 4 dürften sich aufgrund der räumlichen Nähe sofort auf diese Schlaufe übertragen. Damit ist möglicherweise ein direkter Zusammenhang zwischen Calciumbindung und Freilegung des aktiven Zentrums gegeben. Eine mögliche Ursache für die Änderung der Bewegungsrichtung könnte eine leicht veränderte Lage der Domäne sein, die im folgenden Abschnitt untersucht werden soll.

5.3.3 Domänenverlagerungen

Während die Analyse der TLS-Parameter Aussagen über die Beweglichkeit der einzelnen Domänen erlaubt, gibt sie keine Auskunft über Änderungen in der Struktur selbst. Die Frage, inwieweit sich die Orientierung einer Domäne geändert hat, ist nur durch die Auswertung der Atomkoordinaten zu beantworten. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen FXIII-Strukturen miteinander verglichen und die Unterschiede bezüglich der Orientierung der einzelnen Domänen betrachtet⁷. Dies geschah für jedes einzelne, in der Struktur enthaltene Monomer. Als Referenz diente stets die Domäne 2, da es sich hierbei nicht nur um die größte, sondern auch die zentrale Domäne handelt. Die Bezeichnung Kerndomäne beschreibt das recht treffend. Ein Vergleich der Kerndomänen untereinander ergab fast keine strukturellen Unterschiede. Die wenigen Differenzen sind lokal begrenzt, wie z. B. der Bereich um Gly486, wo sich die Lage der eine Schlaufe bildenden Hauptkette in der orthorhombischen Kristallform von der in den monoklinen Kristallen um ca. 1 Å unterscheidet.

Im den folgenden Abschnitten sind die Domänenbewegungen immer in eine Rotation und eine Translation aufgesplittet. Auf eine dreidimensionale Aufschlüsselung wurde der Übersichtlichkeit wegen verzichtet. Zur Erinnerung sei nochmals erwähnt, dass Domäne 2 als Referenz genutzt wurde und aus diesem Grund in den Tabellen keine Werte für diese Domäne angegeben sind. Pro Domäne sind ein Rotationswinkel und der Betrag des Translationsvektors aufgelistet. Ab wann eine Differenz als signifikant zu betrachten ist, lässt sich nicht genau definieren. Einerseits muss bei der Translationen immer der mittlere Koordinatenfehler⁸ der Struktur beachtet werden. Dessen Wert liegt zwischen 0,3 Å für die monokline Kristallform mit Calcium und 0,5 Å im Falle der orthorhombischen Strukturen. Andererseits werden bei dieser Methode ganze Domänen betrachtet und somit über 100 C_α-Atome zusammengefasst, was den Fehler minimiert. Als Richtwert sei deshalb an dieser Stelle die mittlere Abweichung der C_α-Atom-Positionen innerhalb einer Domäne genannt. Dieser Wert liegt z. B. beim Vergleich der beiden Kerndomänen in der hochaufgelösten FXIII-Struktur mit Calcium bei unter 0,15 Å. Im Falle der orthorhombischen Kristallform mit Calcium sind es 0,21 Å. Für die Translation wurde deshalb alles oberhalb von 0,5 Å als signifikant angesehen. Bei der Rotation ist es ungleich schwieriger, eine Grenze festzulegen. Unter der Annahme, dass die Domänen eine annähernd globuläre Struktur mit einem Durchmesser von 35 Å aufweisen⁹ und der Drehpunkt sich an dem einen Ende befindet, würde sich bei einer Rotation um 1° das entgegengesetzte Ende um 0,6 Å verschieben. Bei einer Gleichverteilung der Atome entspricht dies im Schnitt 0,3 Å. Zum Erreichen der für die Translation gesetzten Grenze von 0,5 Å wäre demnach eine Rotation von 0,8° notwendig. Dieser Wert wurde deshalb als Grenzwert für eine signifikante Bewegung erachtet.

⁷Die angewandte Methode mag umständlich klingen, da mit DYNDOM ein einfach zu bedienendes Programm zur Analyse von Domänenbewegungen existiert. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen FXIII-Strukturen sind für dieses Programm jedoch zu klein.

⁸Der mittlere Koordinatenfehler wurde von dem Programm SFCHECK [93] mit Hilfe der Beziehung zwischen R-Faktor und Auflösung (Luzzati Plot) berechnet.

⁹Betrachtet man nur die C_α-Atome, so besitzt Domäne 1 eine kompakte Form mit einem Durchmesser von ungefähr 40 Å und die einander recht ähnlichen, zylinderförmigen Domänen 3 und 4 haben etwa einen Durchmesser von 25 Å und eine Länge von 45 Å.

Bezugsdomäne	ohne Calcium		mit Calcium	
	Rotation in °	Translation in Å	Rotation in °	Translation in Å
A1	1,38	1,15	1,63	1,89
A3	1,38	0,87	1,83	2,63
A4	1,22	1,22	1,27	2,07
B1	2,40	0,81	1,93	0,48
B3	2,63	2,44	1,98	1,70
B4	2,44	0,66	1,39	0,09

Tabelle 5.4: Unterschiede zwischen den FXIII-Strukturen in der monoklinen und der orthorhombischen Kristallform.

Unberücksichtigt bleibt jedoch die Überlagerung der beiden Bewegungen, die zur Verstärkung bzw. zur Abschwächung der Positionsänderung führen kann.

Differenzen zwischen der orthorhombischen und der monoklinen Kristallform

Einen Unterschied zwischen den FXIII-Strukturen in der orthorhombischen und der monoklinen Kristallform kann man nicht nur auf der Basis der Kristallkontakte und der thermischen Bewegung erkennen. Auch bei der Analyse der Lage der einzelnen Domänen ist eindeutig eine Differenz zwischen den beiden Gruppen zu sehen. Die in Tabelle 5.4 aufgelisteten Werte beschreiben die Abweichungen in der Lage der einzelnen Domänen.

Zunächst kann man beim Betrachten der aufgelisteten Werte einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Monomeren erkennen. Obwohl immer von zwei identischen Monomeren die Rede ist, sind diese bei genauer Betrachtung in struktureller Hinsicht gar nicht mehr identisch. Dabei sollten die anscheinend kleinen Zahlen nicht täuschen. Eine Drehung um $2,6^\circ$ bedeutet bei einer rund 45 \AA langen Domäne immerhin eine Bewegung um 2 \AA . Die starken Differenzen haben ihre Ursache mit Sicherheit zu einem gewissen Teil in der unterschiedlichen Definition des Dimers in den zwei verschiedenen Raumgruppen (siehe Seite 77). Davon unberührt bleibt aber, dass es sich hierbei um Domänenverschiebungen innerhalb der Struktur handelt und nicht um eine Bewegung der Struktur selbst.

Wirklich verblüffend ist die Tatsache, dass sich hier erstmals ein deutlicher Effekt von Calcium zeigt. Während sich ohne Calcium die Anordnung der Domänen in den A-Monomeren beider Kristallformen deutlich weniger unterscheidet als die in den B-Monomeren, kommt es durch die Zugabe von Calcium zu einer gewissen Angleichung der Differenzen. Man könnte dies dadurch erklären, dass ohne Calcium die Struktur primär von der Kristallpackung beeinflusst wird. Mit der Zugabe von 100 mM Calcium setzt eigentlich die Aktivierung ein, die aber aufgrund des Kristallgitters nicht vollzogen werden kann. Es werden aber sicherlich die begrenzten Spielräume innerhalb des Kristallgitters genutzt, und die Struktur „bewegt sich“ in Richtung aktive Konformation. Da diese aber für alle FXIII-Moleküle unabhängig von der Kristallform gleich ist, kommt es zu einer Angleichung der Unterschiede zwischen den einzelnen Monomeren.

Unterschiede zwischen den beiden monoklinen Kristallformen

Wie bereits auf Seite 44 erwähnt, unterscheiden sich die beiden monoklinen Kristallformen in der leicht veränderten Kristallpackung. Mit einfachen Worten beschrie-

Bezugsdomäne	1. Dimer (A- und B-Kette)		2. Dimer (C- und D-Kette)	
	Rotation in °	Translation in Å	Rotation in °	Translation in Å
A1	0,91	1,30	1,59	2,16
A3	2,20	3,17	1,27	1,70
A4	0,63	0,70	1,68	2,10
B1	1,12	0,83	0,91	0,55
B3	1,39	0,92	2,40	1,93
B4	0,75	0,34	1,71	1,39

Tabelle 5.5: Unterschiede zwischen den beiden verschiedenen FXIII-Strukturen in der monoklinen Kristallform ohne Calcium.

ben, werden die Proteinmoleküle durch den Entzug von Wasser¹⁰ gezwungen, dichter zu packen. Dies führt bei jedem zweiten Molekül zu eine Drehung um $4,86^\circ$ und damit zur Störung der Symmetrie. Die Folge ist eine neue Einheitszelle. Eine interessante Fragestellung lautet nun, ob dies zusätzlich zu Verschiebungen von einzelnen Domänen führt. Die Antwort liefert Tabelle 5.5, in der die Unterschiede bezüglich der Lage der Domänen dieser Struktur und der nativen monoklinen FXIII-Struktur aufgelistet sind.

Deutlich zu erkennen ist die Verschiebung von Domäne 3 des A- und des D-Monomers. Es liegt auf der Hand, bei dieser Konstellation an ein Vertauschen der C- und D-Kette zu glauben, da bisher stets die A-Kette mit der C-Kette als ähnlich beschrieben wurden. Eine Untersuchung der Kristallkontakte zeigte aber, dass hier keine Verwechslung vorlag. Etwas überraschend ist auch, dass Domäne 4 im A- und dem B-Monomer eine nahezu identische Position wie in der Referenzstruktur einnimmt. Nur die Lage Domäne 3 ändert sich und das auch recht deutlich. Des Weiteren ist offensichtlich vor allem im C-Monomer die Orientierung der Domänen etwas verschieden von der „normalen“ Form. Der Unterschied zwischen den beiden Strukturen besteht demnach nicht nur in der oben erwähnten Drehung des Dimers um knapp 5° , sondern es ändert sich auch die Lage der einzelnen Domänen. Das verdeutlicht auch, wie flexibel die gesamte Struktur ist, da immerhin Verschiebungen der Hauptkette von mehr als 1 \AA anscheinend ohne Probleme möglich sind. Zusätzlich zeigt dies auch, warum die Kristalle zunächst Risse bekamen, die erst über einen Zeitraum von vielen Stunden langsam wieder verschwanden. Es waren komplexe Bewegungen notwendig, bis die endgültige Struktur erreicht wurde. Am Ende unterscheidet sie sich von der Ausgangsstruktur ähnlich stark, wie diese von der orthorhombischen Form.

Der Einfluss von Calcium auf die FXIII-Strukturen

Es ist bereits an anderer Stelle erwähnt worden, dass sich überraschenderweise durch die Zugabe von 100 mM Calcium in der Struktur fast keine Änderungen ergeben. Zumindest in der bestimmten Kristallstruktur gibt es, sieht man von Seitenkettenkonformationen ab, keine signifikanten Differenzen zur Struktur ohne Calcium. Im völligen Gegensatz dazu steht das Wissen um die Wirkung dieser Calciumkonzentration auf gelösten Faktor XIII. Die Ursache der Diskrepanz liegt offensichtlich im Kristallgitter, welches die Konformationsänderungen hin zum aktiven Enzym stark behindert. Erhöht man durch eine Steigerung der Calciumkonzentration den Druck auf das Kristallgitter, kommt es schließlich zur Zerstörung des Kristalls, wie in Abbildung 4.7 gezeigt wurde.

¹⁰Der Wassergehalt verringerte sich durch die Erhöhung der PEG 6000-Konzentration im Reservoir von 57% auf 51% .

Bezugsdomäne	monokline Strukturen		orthorhombische Strukturen	
	Rotation in °	Translation in Å	Rotation in °	Translation in Å
A1	0	0,10	0,31	0,34
A3	0,44	0,71	0	0,12
A4	0,26	0,34	0	0,16
B1	0,65	0,17	0	0,04
B3	0,83	0,51	0	0,19
B4	0,36	0,28	0,26	0,13

Tabelle 5.6: Unterschiede zwischen den FXIII-Strukturen mit und ohne Calcium.

Nach den vielversprechenden Werten in Tabelle 5.4 war es um so wichtiger, die verschiedenen Strukturen mit und ohne Calcium miteinander zu vergleichen. Ein Blick auf Tabelle 5.6 zeigt aber, dass es gerade bei diesem Vergleich bis auf die Domäne 3 keine signifikanten Unterschiede zu beobachten gibt. Und auch diese eine Ausnahme liegt mit ihren Werten zur Rotation und Translation nur knapp über den Grenzwerten. Zusammenfassend kann man deshalb sagen, dass die beiden Strukturen in der orthorhombischen Raumgruppe bezüglich der Lage der Domänen fast identisch sind. In der monoklinen Raumgruppe sind dagegen kleine Unterschiede zu erkennen, die sich aber auf Domäne 3 beschränken.

5.3.4 Strukturvergleich mit dem Programm ESCET

Eine weitere Möglichkeit Unterschiede zwischen den Strukturen zu finden, bietet das Programm ESCET. Es berechnet unter Berücksichtigung des Koordinatenfehlers eine Differenz-Matrix und identifiziert damit die invarianten und die flexiblen Teile der Struktur¹¹. Wenn hier von flexiblen Strukturabschnitten geschrieben wird, so darf dies nicht mit den Bereichen verwechselt werden, die einen hohen Temperaturfaktor aufweisen. In Bezug auf die Auswertung mit ESCET versteht man darunter die Teile der Struktur, deren exakte Position sich in den einzelnen Strukturen unterscheiden. Diese Strukturabschnitte erweisen sich demnach erst im Vergleich mit anderen Kristallstrukturen als flexibel. Bereiche mit einem hohen Temperaturfaktor hingegen sind per se flexibel, weil sie mehr oder weniger stark um eine bestimmte Ruheposition schwingen. In diesem Fall unterscheidet sich die exakte Position dieser Atome von Molekül zu Molekül innerhalb eines Proteinkristalls. Abbildung 5.9 soll als Orientierung dienen, welche Bereiche der FXIII-Struktur einen hohen und welche einen niedrigen Temperaturfaktor aufweisen. Zu diesem Zweck wurden die Temperaturfaktoren der C_{α} -Atome verwendet und jeder Aminosäure eine Farbe zwischen Blau (unflexibel, B-Faktor $\leq 20 \text{ \AA}^2$) und Rot (sehr beweglich, B-Faktor $\leq 100 \text{ \AA}^2$) zugewiesen.

Zur Analyse der Faktor XIII-Struktur wurden alle im Zuge dieser Arbeit verfeinerten Strukturen verwendet. Somit standen 12 verschiedene Monomere zu Verfügung. Es waren dies 4 Monomere aus der monoklinen Struktur mit langer Zellaachse, weitere 4 Monomere aus den monoklinen Strukturen mit und ohne Calcium und 4 Monomere aus den orthorhombischen Strukturen. Diese Monomere wurden miteinander verglichen und zur Bestimmung der beweglichen Strukturabschnitte verwendet.

Da sich immer Unterschiede zwischen zwei verschiedenen Strukturen finden lassen, ist es notwendig, einen unteren Schwellenwert für die Auswertung der Struktur-differenzen durch ESCET anzugeben. Erst wenn sich die Lage eines Atoms um mehr als diesen Betrag verändert, wird die Lageänderung als signifikant angesehen. Die-

¹¹näheres siehe Seite 29

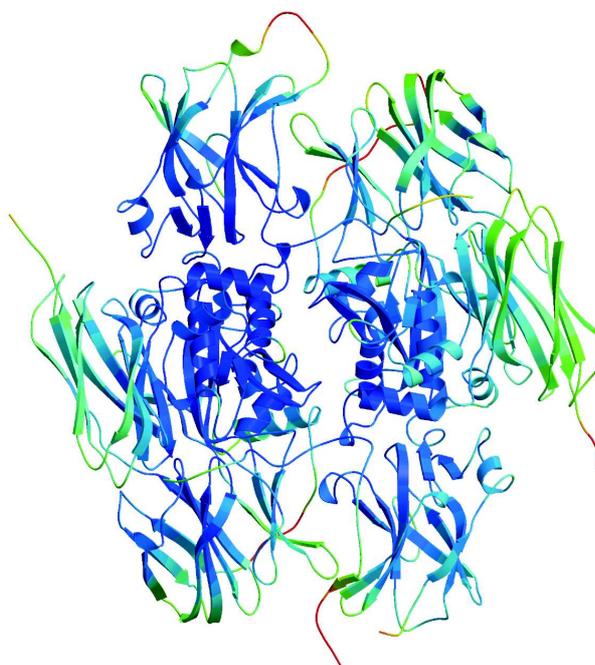


Abbildung 5.9: Visualisierung der Temperaturfaktoren am Beispiel der monoklinen Struktur mit Calcium. Die sehr gut definierten Teile der Struktur sind blau und die flexiblen Bereiche rot markiert.

ser Wert hat einen großen Einfluss auf die Auswertung. Wird er zu hoch angesetzt, kommt ESCET zu dem Schluss, dass sich die Strukturen wie ein Ei dem anderen gleichen. Ein zu geringer Schwellenwert wiederum lässt die Unterschiede scheinbar ins Unermessliche anwachsen. Zur Bestimmung eines sinnvollen Schwellenwertes wurde eine Reihe von Berechnungen durchgeführt, bei der dieser Grenzwert variiert wurde. Die Auswahl erfolgte mittels der folgenden, willkürlich aufgestellten Regeln:

1. Der invariante Teil der Struktur sollte deutlich mehr als 50 % betragen.
2. Das aktive Zentrum musste zum invarianten Teil der Struktur gehören.
3. Alle großen flexiblen Schlaufen mussten zum variablen Teil der Struktur zählen.
4. Der Schwellenwert sollte nur auf eine halbe Standardabweichung genau angegeben werden, weil für einen solchen frei gewählten Wert eine größere Genauigkeit nicht sinnvoll erschien.

Wie erwartet reagierte ESCET auf diesen Wert sehr empfindlich. Es stellte sich aber auch sehr schnell heraus, dass nur ein Schwellenwert von $2,5\sigma$ ¹² alle Bedingungen erfüllte. Zur Verdeutlichung ist in Abb. 5.10 das Ergebnis von drei verschiedenen Berechnungen dargestellt. Dabei ist eine deutliche „Stabilisierung“ der Struktur mit ansteigendem Schwellenwert zu beobachten. Dies spiegelt sich eindeutig in dem prozentualen Anteil der invarianten Bereiche wieder. Liegt dieser Anteil bei einem Schwellenwert von 2σ noch bei 31,1 %, so steigt er über 63,7 % ($2,5\sigma$) auf 80,5 % bei 3σ . Vergleicht man die unterschiedlichen Ergebnisse miteinander, lassen sich sowohl die unbeweglichen Teile der Struktur als auch die Bereiche schnell identifi-

¹²Werden bei Berechnung der Strukturunterschiede die abgeschätzten Koordinatenfehler der jeweiligen Struktur zum Skalieren verwendet, erfolgt die Ausgabe der Differenzen in einem Vielfachen der Standardabweichung σ .

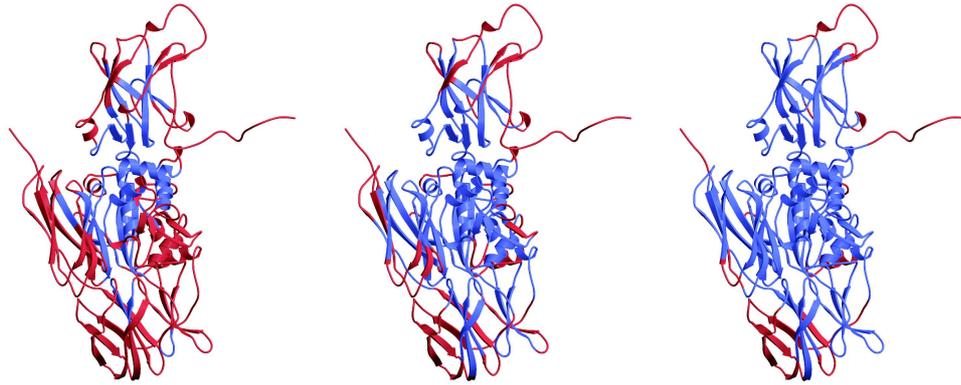


Abbildung 5.10: Die mit ESCET bestimmten strukturell invarianten (blau) und flexiblen Bereiche (rot) der FXIII-Struktur. Der untere Schwellenwert betrug 2σ , $2,5\sigma$ bzw. 3σ (v.l.n.r.).

zieren, deren Lage sich offensichtlich deutlich ändert. Keine Überraschung ist die Tatsache, dass N- und C-Terminus, sowie die großen Schleifen sehr flexibel sind. Auch die Beweglichkeit der halben Domäne 3 war, wenn auch nicht in diesem Ausmaße, vorherzusehen. Unerwartet war aber der Fakt, dass eine α -Helix von Domäne 2 anscheinend sehr stark ihre Lage ändert. Es handelt sich dabei um den Abschnitt Glu484 bis Glu495. Möglicherweise macht sich hier die Calciumbindung bemerkbar, da die zahlreichen negativ geladenen Aminosäuren in diesem Bereich (Glu485, Glu490, Glu488, Glu489, Glu490 und Glu495) die Calcium-Bindungstasche flankieren und teilweise nur $4,56 \text{ \AA}$ von dem gebundenen Calciumion entfernt sind. Dieser Abstand ist zwar für eine direkte Bindung zu groß, aber ionische Wechselwirkungen haben eine sehr große Reichweite. Schließlich geht der Abstand bei der Berechnung der Interaktion zwischen zwei Ladungsträgern nur linear in die Gleichung ein¹³.

Mit dem zuvor bestimmten unteren Schwellenwert von $2,5\sigma$ verglich ESCET alle 12 Strukturen miteinander und kam zu den in der Tabelle 5.7 angegebenen Werten. Diese geben an, bei wie viel Prozent aller zur Berechnung der Differenzmatrix berücksichtigten C_α -Paare eine Positionsänderung unterhalb des Schwellenwertes aufweisen. Interessanterweise sind besonders bei den orthorhombischen Strukturen große Übereinstimmungen zu finden. Ein Blick auf die von dem Koordinatenfehler abgeleitete Standardabweichung zeigt aber, dass die Differenzen in diesem Fall auch recht hoch sein müssen, um über dem Schwellenwert zu liegen. Desweiteren bestätigt sich wieder, dass in den monoklinen Strukturen signifikante Unterschiede zwischen den beiden das Dimer bildenden Untereinheiten bestehen. In den orthorhombischen Strukturen ist dies nicht der Fall. Überraschend ist aber, dass die angesprochenen Unterschiede innerhalb einer Struktur deutlich größer sind als z. B. zwischen den A-Untereinheit der nativen Struktur und A-Untereinheit des Komplexes mit Calcium. So beträgt die Übereinstimmung zwischen der A- und B-Kette in der nativen monoklinen Struktur nur 87,2%, aber die Übereinstimmung der beiden A-Ketten in der nativen und der Calcium-haltigen Form beträgt 98,2%. Noch klarer ist der Unterschied bei Betrachtung der Komplexes mit Calcium in der monoklinen Kristallform. Nur knapp 71% aller C_α - C_α -Abstände liegen hier unterhalb des Schwellenwertes. Verglichen mit dem jeweiligen Monomer ohne Calcium ergeben sich dagegen Werte von 98,2% für die A- bzw. 95,8% für die B-Kette. Auch die bereits bekannte Bezie-

¹³Die Bindungsenergie zwischen zwei Ladungen berechnet sich wie folgt: $E = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \frac{Q_1 Q_2}{r}$. Dagegen geht der Abstand bei der Berechnung der Bindungsenergien von Wasserstoffbrückenbindungen (Dipol-Wechselwirkungen) unter Berücksichtigung der Brownschen Molekülbewegung mit dem Faktor $\frac{1}{r^6}$ ein.

	MBB	MBC	MBD	MNA	MNB	MCA	MCB	ONA	ONB	OCA	OCB
σ in Å	0,10	0,10	0,10	0,07	0,07	0,04	0,04	0,19	0,19	0,26	0,26
MBA	89,7	93,4	84,3	87,5	82,6	84,0	76,3	93,7	92,4	96,4	96,4
MBB		92,2	96,5	89,0	88,7	84,6	86,5	96,8	95,2	98,2	98,2
MBC			87,1	89,8	82,7	85,4	76,6	95,0	93,3	97,1	96,7
MBD				81,9	85,8	75,2	80,1	95,7	93,6	97,2	97,3
MNA					87,2	98,2	81,8	95,1	93,3	97,1	97,4
MNB						80,7	95,8	92,6	90,8	95,7	95,6
MCA							71,8	93,2	91,6	96,3	96,5
MCB								91,8	90,7	95,6	95,5
ONA									99,1	99,8	99,6
ONB										99,5	99,7
OCA											99,9

Tabelle 5.7: Angegeben ist die prozentuale Übereinstimmung der FXIII-Untereinheiten. Zusätzlich ist in der zweiten Zeile die Höhe der mittleren abgeschätzten Standardabweichung für die jeweilige Struktur zu finden. Der erste Buchstabe im Strukturcode steht für die Kristallform (M=monoklin, O=orthorhombisch) und der zweite charakterisiert die Struktur (N=nativ, C=mit Calcium, B=lange Zellachse). Die Bezeichnung der betrachteten Proteinkette ist an dritter Stelle zu finden.

hung zwischen der A- und der C-Kette, sowie zwischen der B- und der D-Kette in der monoklinen Kristallform mit langer Zellachse wird durch die in der Tabelle aufgelisteten Werte bestätigt. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Strukturen an sich einander sehr stark ähneln und somit eine Betrachtung einzelner Paare im Detail notwendig ist.

Vergleich der Strukturen mit bzw. ohne Calcium in der monoklinen Kristallform

Ein großes Ziel dieser Arbeit ist das Aufspüren struktureller Differenzen zwischen der Calcium-freien und Calcium-gebundenen Form. Deshalb ist das erste Paar, das genauer untersucht werden soll, der Vergleich zwischen den beider A-Untereinheiten der Faktor XIII-Struktur mit bzw. ohne Calcium in der monoklinen Kristallform. Diese beiden Strukturen sind sehr gut definiert und strukturelle Unterschiede sollten demnach, falls vorhanden, am ehesten bei diesem Vergleich zu finden sein. Wie bereits erwähnt, gibt es signifikante Unterschiede zwischen den A- und B-Monomeren. Deshalb war es notwendig, sich auf die Betrachtung eines Monomers zu beschränken. Die Wahl fiel auf das A-Monomer, da dies über weite Strecken eine etwas bessere Elektronendichte als das B-Monomer aufweist und deshalb auch einen kleineren durchschnittlichen Temperaturfaktor besitzt. Mit dem Programm ESCET wurde schließlich die in Abb. 5.11 dargestellte Grafik erzeugt, die die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der beiden Strukturen veranschaulichen soll.

Zunächst aber einige Erläuterungen zu dem Dargestellten, die zum besseren Verständnis beitragen sollen. Wie bereits beschrieben, berechnet das Programm die Abstände zwischen den C_{α} -Atomen einer Struktur und vergleicht dann diese Werte mit den von einer anderen Struktur stammenden Werten. So ergeben sich Daten über die Abstandsänderungen von allen C_{α} -Atomen zu allen C_{α} -Atomen. Da diese Menge an Ergebnissen schlecht darzustellen ist, fasst ESCET im Falle von FXIII

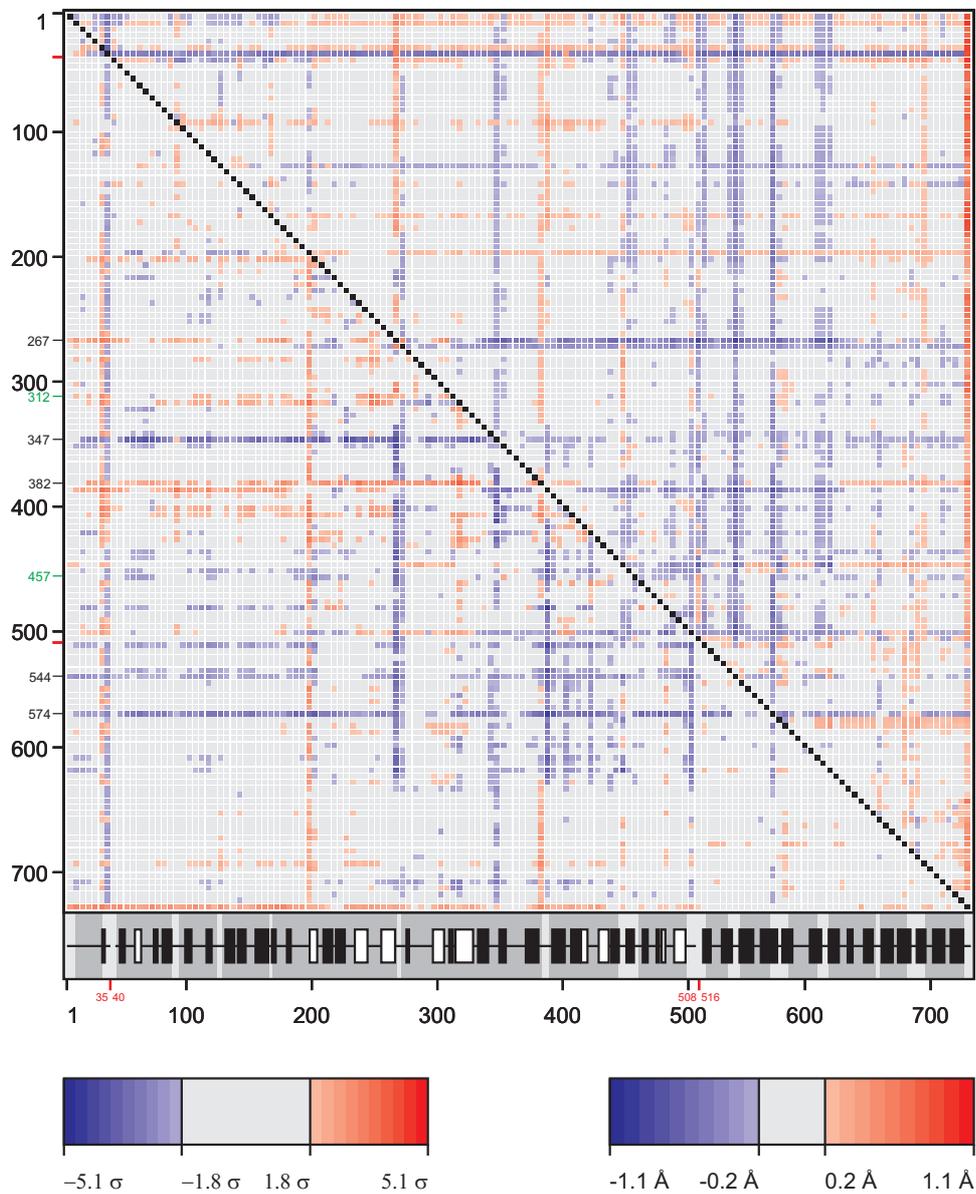


Abbildung 5.11: Vergleich der A-Kette in der nativen Struktur mit der im Komplex mit Calcium (beides monokline Kristallform), wobei die A-Kette der nativen Struktur die Referenz ist.

jeweils 5 Werte zusammen¹⁴. Anschließend stellt das Programm nur die maximale Abweichung dieser Gruppe zu allen anderen Gruppen dar, wobei anhand einer Farbskala jeder Abweichung eine Farbe zugeteilt wird. Das Ergebnis ist z. B. in Abb. 5.11 zu sehen. Zur besseren Einschätzung der Abweichungen wurde zusätzlich zu der fehlerskalierten Differenzmatrix eine unskalierte Differenzmatrix berechnet, deren Ergebnisse in Ångström angegeben sind. Diese ist in allen Abbildungen dieser Art in der rechten, oberen Hälfte zu finden. Die schwarz eingezeichnete Diagonale trennt die beiden Teile voneinander ab. Die fehlerskalierte Differenzmatrix liefert definitiv die sinnvolleren Ergebnisse, weil sie die Genauigkeit der bestimmten Atomposition berücksichtigt. Allerdings lässt sich mit den Angaben in σ nicht so recht ein Gefühl für die reale Größe der Unterschiede erreichen. Angaben in Ångström sind unter diesem Gesichtspunkt aussagekräftiger. Die Unterschiede zwischen den beiden Methoden bezogen auf das Ergebnis sind nicht groß. Es sind aber einige Abweichungen zu erkennen.

Wie schon bei der Festlegung des unteren Schwellenwertes, ist auch die Festlegung der Limits für die Farbskala von großer Bedeutung, wenn auch nur für die Wahrnehmung der Ergebnisse. Um eine neutrale Regelung für alle Darstellungen zu finden, wurde für jeden Vergleich der Mittelwert aller Positionsabweichungen berechnet. Der dreifache Mittelwert stellt stets das Minimum und die höchste Positionsabweichung das Maximum in der Farbskala dar. Im Falle der beiden A-Ketten mit bzw. ohne Calcium ergaben sich z. B. Differenzen von 0 bis $5,14\sigma$ und der Mittelwert lag bei $0,60\sigma$. Somit wurde das untere Limit in der Farbskala auf $1,8\sigma$ und das obere Limit auf $5,1\sigma$ gesetzt. Nach der gleichen Methode erfolgte die Skalierung aller anderen Darstellungen.

Beim Vergleich unterschiedlicher Strukturen können selbstverständlich nur die Regionen in Betracht gezogen werden, die in beiden Strukturen vorhanden sind. Fehlende Abschnitte sind auf der x- und der y-Achse durch rote Markierungen gekennzeichnet. In der ersten Abbildung dieser Art kann man auf der x-Achse zwei solche Markierungen erkennen, die auch beschriftet sind. So wurden bei der Berechnung und Darstellung der Differenzmatrix alle Aminosäuren zwischen Val35 und Asn40, sowie zwischen Thr508 und Ser516 ausgeklammert, da diese in der A-Kette der nativen Struktur fehlen¹⁵. Somit wurden 720 Aminosäuren bei der Berechnung der Differenzmatrix berücksichtigt. Als Orientierungshilfe wurden die Gruppe, zu der auch das aktive Zentrum (Cys314) gehört und die in der Calciumbindung involvierte Gruppe mit Ala457 grün markiert. Zusätzlich erfolgte eine Markierung von besonders auffälligen Gruppen, damit diese leichter zu identifizieren sind. Bei allen Gruppen ist immer die Nummer der zentralen Aminosäure angegeben. Desweiteren befindet unterhalb der Differenzmatrix eine Übersicht über die Sekundärstruktur. Schwarze Rechtecke stehen dabei für β -Stränge und weiße Rechtecke für α -Helices. Die dunkel hinterlegten Abschnitte gehören zum invariante Teil der Struktur, während die hell unterlegten Abschnitte von ESCET als flexibel identifiziert wurden.

Betrachtet man nun die beiden A-Ketten in der nativen bzw. der Struktur mit Calcium in Abb. 5.11, so sind horizontale bzw. vertikale rote und blaue Linien zu erkennen. Diese markieren Bereiche haben entweder ihren Abstand zu einem Großteil der restlichen Struktur verringert (blau) oder aber sich entfernt (rot), wobei sich diese Angaben auf die A-Kette in der nativen Struktur beziehen. Zusätzlich korreliert die Intensität der Farbe mit der Größe der Positionsänderung. In der Regel sind beide Effekte gleichzeitig zu beobachten. Dies ist z. B. im Bereich von Asn267 zu sehen. Die Abstände zu den N-terminal gelegenen Resten vergrößern sich teilweise recht deutlich, aber zu dem C-terminal gelegenen Bereich ist eindeutig eine Verringerung der Entfernung zu erkennen. Dieser interessante Abschnitt um Asn267 befindet sich nahe der zweizähligen nichtkristallographischen Achse zwischen den beiden Monomeren. Die zu dieser Gruppe gehörende Aminosäure Asp270 war schon bei ver-

¹⁴ESCET stellt höchstens 150×150 Messwerte dar, damit nach Meinung des Autors dieses Programms die Fülle an Informationen auch problemlos erfasst werden kann. Bei 731 Aminosäuren werden deshalb stets 5 Werte zusammengefasst.

¹⁵Damit keine Irritationen aufkommen: Diese Aminosäuren sind natürlich in der A-Kette der nativen Struktur vorhanden, aber deren Position ist in der Elektronendichte nicht genau bestimmbar. Deshalb fehlen sie in der Struktur-Datei und können nicht von ESCET verwendet werden.

schiedenen Strukturen im Ramachandran-Plot aufgefallen, da diese Aminosäure in einer nicht gut definierten Schlaufe liegt. Somit ist eine Strukturänderung in diesem Bereich weder überraschend noch von großer Bedeutung. Auch die üblicherweise weniger gut definierten Bereiche zwischen Glu30 und Leu45, sowie zwischen Thr508 und Ser516 erscheinen in der ESCET-Analyse als bewegliche Strukturabschnitte, werden aber weder hier noch in allen folgenden Auswertungen besprochen, weil sie in allen FXIII-Strukturen in der Elektronendichte schlecht definiert sind.

Zum besseren Verständnis des von ESCET berechneten Diagramms ist das in Abb. 5.11 gezeigte Ergebnis in Abb. 5.12 nochmals in einer anderen Art und Weise dargestellt. Die auffälligen Bereiche sind hier in der FXIII-Struktur rot markiert, damit deren Lage innerhalb des Proteins sichtbar wird. Die Häufung solcher Abschnitte im Dimer-Interface deutet auf eine Verschiebung der einzelnen Monomere hin. Durch die Bindung der Calciumionen könnte es demnach zu einem Zusammenrücken oder aber einem Auseinanderdriften der beiden Monomere kommen. Eine Bestimmung der C_{α} -Abstände zwischen Cys314A und Cys314B, sowie His373A–His373B und Asp396A–Asp396B ergab aber keine signifikanten Änderungen. Offensichtlich handelt es sich hierbei nur um lokale Differenzen, z. B. flexible Schlaufen betreffend. Da sich auf den ersten Blick kein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Strukturabschnitten herstellen lässt, werden im Folgenden die auffälligen Bereiche einzeln besprochen.

Der erste Abschnitt umfasst die Aminosäuren Leu195–Tyr204 und befindet sich am Anfang von Domäne 2. Zwar vermittelt Abb. 5.12 den Eindruck eines direkten Kontakts mit Domäne 4, aber man findet in diesem Teil der Struktur nur einen Kristallkontakt mit Lys534 des Nachbarmoleküls. Laut ESCET ändert sich die Lage der Aminosäuren so, dass sich der Abstand zum Rest des Moleküls verringert. Ein Blick auf die Größe der Einheitszelle in den beiden miteinander verglichenen Strukturen belegt dies: Die Ca^{2+} -haltige Einheitszelle ist kleiner als die native. Entlang der a-Achse beträgt der Unterschied sogar 1 Å. Diese Verkürzung zeigt sich u. a. in einer Verschiebung dieses Abschnitts. Die Calcium-Bindung selbst hat damit anscheinend nichts zu tun.

Die folgenden Bereiche (Met265–Lys269, Asp345–Gln349, Met380–Phe389 und Tyr500–Lys504) befinden sich alle im Dimerinterface ohne selbst direkte Dimer- oder Kristallkontakte auszubilden. Allen gemeinsam ist außerdem, dass sie in Schlaufen liegen und sich weit entfernt vom aktiven Zentrum und der Calcium-Bindungsstelle befinden. Es kann sich demnach nur um kleinere, lokale Änderungen handeln, die nicht direkt mit der Calciumbindung verknüpft sind.

Auch die beiden letzten Teile der FXIII-Struktur deren Position sich im Zuge der Calciumbindung ändert (Asn542–Arg546 und Thr572–Thr576) liegen von den beiden genannten wichtigen Orten, dem aktiven Zentrum und dem Calciumbindungsort, sehr weit entfernt. Des Weiteren sind sie in keine direkten Kristallkontakte involviert, so dass es in diesem Fall schwierig ist, eine Ursache für die beobachtete Bewegung zu finden. Der Bereich um His544 weist nur eine geringe Positionsänderung auf und befindet sich in einer Schlaufe. Somit kann man hier von einer lokalen Strukturänderung ohne besondere Bedeutung sprechen. Im Falle des Abschnitts Thr572–Thr576 ist die Positionsänderung in Abb. 5.11 aber deutlich zu sehen. Dieser Teil eines β -Strangs entfernt sich deutlich vom Rest der Struktur. Die

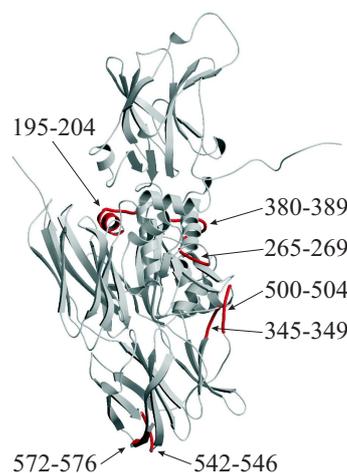


Abbildung 5.12: Lage der laut ESCET beweglichen Bereiche

Ursache hierfür liegt teilweise bei ESCET. Wie bereits erwähnt, fasst ESCET zur Vereinfachung immer mehrere Aminosäuren zu einer Gruppe zusammen und gibt für diese Gruppe die größte Einzelabweichung an. In diesem Fall ist es der Wert von Phe573. Dieses Phenylalanin weist in den beiden Strukturen unterschiedliche Konformationen auf, die aber beide durch die Elektronendichte bestätigt werden. Dies führt zu einer Differenz in der C_{α} -Position um $0,65 \text{ \AA}$ und damit zu einem starken Signal im ESCET-Diagramm. Sucht man nach den Ursachen für diesen Unterschied, findet sich nichts, was mit der Calcium-Bindung zu tun hat. Durch eine andere Position der Seitenkette von Glu571 ergibt sich für Phe573 die Möglichkeit, mit Val587 in Kontakt zu treten. Diese Aminosäure liegt $3,3 \text{ \AA}$ entfernt, was für hydrophobe Wechselwirkungen kein ungewöhnlicher Wert ist. In der Struktur mit Calcium hingegen kommt es zu einer hydrophoben Wechselwirkung mit dem $3,38 \text{ \AA}$ entfernten Rest Ile537. Warum aber Glu571, das auf der Oberfläche liegt und keinerlei Kontakte zu anderen Aminosäuren ausbildet, seine Konformation ändert, bleibt unklar.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich auch mit dieser Methode keine bedeutenden Unterschiede zwischen der Struktur mit Calcium und der Struktur ohne Calcium in der monoklinen Kristallform ausfindig gemacht werden können. Eine mögliche Erklärung dafür könnte das relativ feste Kristallgitter liefern, welches größere Strukturänderungen unmöglich macht. Dass es eine Reaktion auf die Calciumbindung gibt, konnte bereits gezeigt werden (siehe Seite 40). Dass aber nicht einmal eine kleine Konformationsänderung bei dem Vergleich der beiden Strukturen gefunden werden konnte, ist enttäuschend.

Vergleich der orthorhombischen Strukturen mit bzw. ohne Calcium

Da sich durch die Zugabe von Calcium in der monoklinen Kristallform anscheinend keine bedeutenden Strukturunterschiede ergaben, ruhten die Hoffnungen nun auf der orthorhombischen Kristallform. Auch in diesem Fall wurden die beiden A-Ketten miteinander verglichen und wieder diente die A-Kette der nativen Struktur als Referenz. Das Ergebnis ist in Abb. 5.13 als Strukturbild und in Abb. 5.14 als Diagramm zu sehen. Aufgrund in der Struktur nicht enthaltener Aminosäuren, konnten nur die Bereiche von Phe8–Leu31 und Glu43–Pro729 miteinander verglichen werden. Außerdem zeigten sich wieder deutliche Strukturänderungen in den weniger gut definierten Bereichen, wie z. B. um Met512. Dies ist an dem deutlich sichtbaren Signal um diese Region herum zu erkennen. Insgesamt aber unterscheiden sich die beiden Strukturen nicht so deutlich voneinander, wie die im vorangegangenen Abschnitt besprochenen monoklinen Strukturen. Dies war aber nach den in Tabelle 5.7 aufgelisteten Daten auch nicht anders zu erwarten.

Bei Betrachtung der Strukturunterschiede fällt auf, dass sich fast alle diese Bereiche in den Kontaktflächen zwischen Domäne 2, Domäne 3 und Domäne 4 liegen. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass die Bindung von Calcium eine leichte Änderung der Lage der Domänen zueinander verursachen könnte. Allerdings sind 4 der 7 Abschnitte relativ bewegliche Schlaufen, so dass deren Aussagekraft nicht zu hoch bewertet werden darf. Des Weiteren sind die gefundenen Differenzen nicht groß. Das Hauptargument gegen eine solche Lageänderung ist jedoch, dass dieser

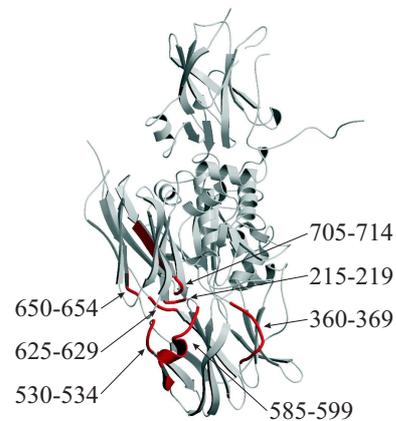


Abbildung 5.13: Lage der laut ESCET beweglichen Bereiche

Effekt nur bei einem sehr geringen Teil der einzelnen Domänen sichtbar ist. Der überwiegende Teil der Struktur ändert seine Lage nicht signifikant.

Besonders erwähnenswert ist der Abschnitt Val360–V369, weil es sich hier um einen Teil des β -Fingers handelt, welchem bereits eine Bedeutung bei der Aktivierung von FXIII zugeschrieben wurde. Zusätzlich findet sich hier ein Kristallkontakt zum Nachbarmolekül über Asp367. Doch auch in diesem Fall befinden sich Calcium-Bindungsort und aktives Zentrum für eine direkte Einflussnahme zu weit entfernt. Damit kann auch in der orthorhombischen Kristallform kein Hinweis auf eine mögliche Konformationsänderung gefunden werden. Zwar sind auch in diesem Fall Unterschiede zwischen den beiden Strukturen zu finden, aber eine Korrelation mit der Calcium-Bindung oder gar eine Verlagerung ganzer Strukturabschnitte, die dann zu einer Freilegung des aktiven Zentrum führen könnten, ist nicht auszuma-chen.

5.4 Inhibitorische Wirkung der synthetisierten Peptide

Wie bereits erwähnt, ist über die Substratbindung an FXIII noch nicht genug bekannt, um problemlos gute Inhibitoren herzustellen. Bei der Synthese der Inhibitoren wurde deshalb auf ein bereits für FXIII optimiertes Substrat zurückgegriffen, welches im Berichrom Assay zum Einsatz kommt. Unbestritten ist, dass FXIII für die enzymatische Reaktion die in diesem Substrat enthaltenen Aminosäuren Lysin und Glutamin benötigt. Aus diesem Grund lag es auf der Hand, eine der beiden Aminosäuren zu modifizieren und so einen einfachen, aber wirkungsvollen Inhibitor zu generieren. Ein Blick auf Abb. 5.15 zeigt aber, dass diese Strategie nicht von Erfolg gekrönt war. Bleibt die Frage nach dem Warum, auf die im Folgenden versucht werden soll, eine Antwort zu geben.

Am Anfang sollte man sich die Bedingungen verdeutlichen, unter denen diese Ergebnisse zustande kamen. Im Berichrom Assay sind neben Thrombin und Calcium auch das Substratpeptid enthalten, welches mit dem zugegebenen Inhibitor konkurriert. Im endgültigen Ansatz liegt dieses Peptid immerhin in einer Konzentration von 1 mM vor. Betrachtet man mit diesem Wissen den in Abb. 5.15 dargestellten Effekt des Ala-Peptids, so verwundert der geringe Einfluss auf die Aktivität nicht mehr so sehr. Es ist nicht zu erwarten, dass durch die Substitution des Glutamins gegen ein Alanin dieses Substrat besser an FXIIIa binden würde. Es ist im Gegenteil damit zu rechnen, dass es signifikant schlechter bindet und seine Verweildauer auf dem Enzym höchstwahrscheinlich deutlich kürzer ist als die des richtigen Substrats. Einen Grund zu dieser Annahme bietet die Tatsache, dass Faktor XIII als relativ langsam arbeitendes Enzym bekannt ist. Das richtige Substrat bindet, wird vorübergehend kovalent gebunden, mit einem zweiten Peptid verknüpft und verlässt danach das Enzym. Dieser komplexe Vorgang braucht verglichen mit anderen enzymatischen Reaktionen relativ viel Zeit. Wenn nun aber der Inhibitor schlechter bindet, und falls er gebunden ist, das Enzym nicht so lange blockiert wie das korrekte Substrat, ist bei gleicher Konzentration von Inhibitor und Substrat nur eine deutlich unter 50 % liegende Hemmung zu erwarten. Dies erklärt zwar noch nicht den schlechten IC_{50} von 183 mM, dämpft aber die Erwartungshaltung an diesen Inhibitor. Außerdem muss beachtet werden, dass es sich hierbei um eine Reaktion von einem Enzym mit zwei Substraten handelt. Das erste Substrat ist ein Glutamin-haltiges und das zweite ein Lysin-haltiges Peptid. Bei allen verwendeten Inhibitoren handelt es sich Peptide, die immer noch ihr Lysin besitzen. Dieses Problem war auch schon bei der Planung der Peptidsynthese bekannt, aber aufgrund der fehlenden Daten über die Wichtigkeit des Lysins für die Bindung des Glutamins, wurde das Lysin nicht

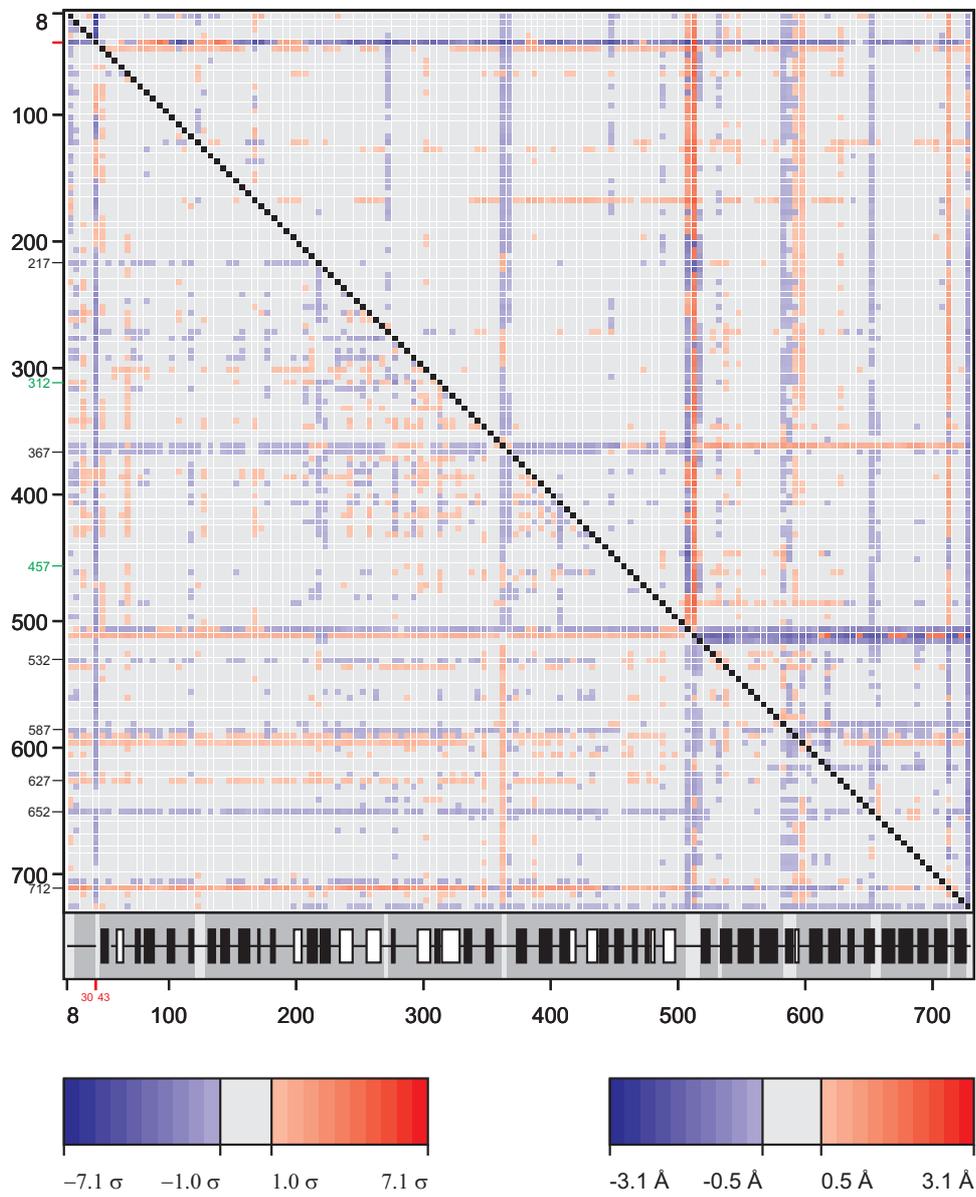


Abbildung 5.14: Vergleich A-Kette in der nativen Struktur mit der in dem Komplex mit Calcium (beides orthorhombische Kristallform), wobei die native Struktur die Referenz ist.

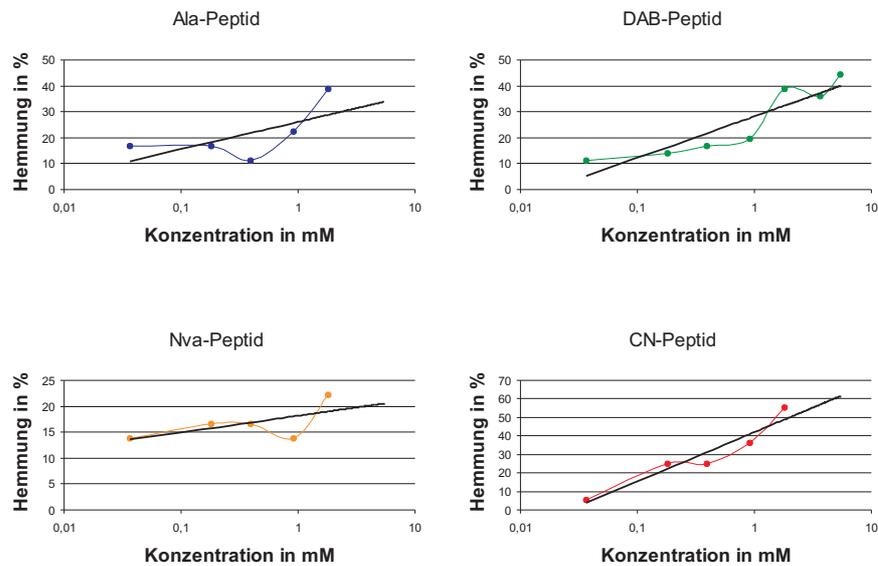


Abbildung 5.15: Wirkung der Peptide im Berichrom Assay. Es sind jeweils die Messergebnisse und eine Ausgleichsgerade dargestellt, welche zur Bestimmung der in Tabelle 4.14 aufgelisteten IC_{50} -Werte herangezogen wurde.

modifiziert oder gar ausgetauscht. Damit wird aber durch die Zugabe des Inhibitors nicht nur ein kompetitiver Inhibitor für das Glutamin-Substrat eingebracht, sondern in gleichem Maße die Konzentration des Lysin-Substrats erhöht.

Der zweite Versuch wurde mit einem Peptid unternommen, welches das hydrophobe Norvalin an Stelle des Glutamins eingebaut hatte. Es ist eindeutig zu sehen, dass die lange hydrophobe Seitenkette des Glutamins wohl ohne Bedeutung für die Substratbindung ist. Das Fehlen des hydrophilen Endes macht sich sogar in einem extrem schlechten IC_{50} bemerkbar, so dass man in diesem Fall wahrscheinlich nicht mehr von einem Inhibitor sprechen kann. Als Nachweis für die Bedeutung der hydrophilen Amid-Gruppe ist dieses Peptid aber sehr wertvoll.

Nach den Ergebnissen des Ala- und Nva-Peptids, sollte der nun folgende Inhibitor mit Diaminobuttersäure eigentlich einen starken Einfluss auf die Aktivität von FXIII nehmen können. Durch die große Ähnlichkeit mit Glutamin sollte die Affinität zum FXIIIa mit dem normalen Substrat vergleichbar sein und die enzymatische Reaktion trotzdem unterbunden werden. Die Ergebnisse beweisen auch eine deutlich bessere Inhibition als es die beiden vorangegangenen Substrate vermochten. Allerdings stellt der IC_{50} von 23 mM noch keinen Durchbruch dar. Anscheinend besitzt das unveränderte Substrat noch immer eine höhere Affinität zum FXIIIa. Als mögliche Ursachen bieten sich mehrere Varianten an. Der gravierendste Unterschied von Glutamin und Diaminobuttersäure ist das Fehlen der Carboxy-Gruppe. Wie es scheint, trägt die partiell negative Ladung des Sauerstoffs viel zur Bindung bei. Aber auch schon die korrekte Positionierung des Stickstoffs könnte eine wichtige Funktion des Sauerstoffs sein. Diese beiden Dinge fehlen aber im Inhibitorpeptid. Hinzu kommt, dass die NH_2 -Gruppe etwas andere chemische Eigenschaften aufweist als die geforderte NH -Gruppe. Diese beiden Gruppen unterscheiden sich nicht nur in der Größe und Ladung, sondern auch in Feinheiten wie der exakten Position der gebundenen Wasserstoffe. Alle diese Gründe zusammen ergeben ein Bild, das Glutamin und Diaminobuttersäure sehr unterschiedlich erscheinen lässt und damit eine Erklärung für das Verhalten gibt.

Die letzte Substanz unterscheidet sich von der Diaminobuttersäure in dem Punkt, dass diesmal anstatt einer Amino- eine Cyanogruppe das polare Ende der Seitenkette bildet. Cyanogruppen werden häufig als Ersatz für Carboxylgruppen oder die bei Reaktionen oft übergangsweise entstehenden Oxanionen verwendet. Nach den Erfahrungen mit der Diaminobuttersäure, überrascht das gute Abschneiden dieses Substratanalogons nicht. Aber selbst die Verbesserung des IC_{50} um den Faktor 10 auf 2 mM ergibt noch keinen guten Inhibitor. Zumindest lehrt dieses Beispiel, dass eine negative Ladung am Ende der Seitenkette mehr für die Bindung des Substrats bringt als eine Aminogruppe. Eine deutlich höhere Affinität als das normale Substrat weist aber auch dieser Inhibitor nicht auf. Dieses Ziel war aber von vornherein nur schwer zu erreichen. Immerhin unterscheiden sich die Inhibitoren und das Substratpeptid genau in der Position, die am gründlichsten vom Enzym „überprüft“ wird, da gerade diese Aminosäure für die enzymatische Reaktion benötigt wird.

Die Ergebnisse der verschiedenen Inhibitoren zeigen, dass es nicht gelungen ist einen potenten Inhibitor zu synthetisieren. Trotzdem ist zumindest das Nitril zur Kokristallisation geeignet, da es eindeutig an FXIIIa bindet und bei der Kristallisation das einzige angebotene Substrat darstellt. Erst mit Hilfe der FXIIIa-Struktur im Komplex mit einem Substrat kann die gezielte Synthese von wirkungsvollen Inhibitoren erfolgen.

5.5 Die aktive Konformation von Faktor XIII

Auch wenn die Kristallisation von FXIIIa misslang, so kann man doch durch das Zusammentragen der bekannten Details ein Bild von dieser Struktur erhalten. Zunächst ist eine dauerhafte Konformationsänderung nicht allein durch eine Thrombin-Aktivierung im Beisein von Calciumionen möglich, wie die dargestellten eigenen und von Yee *et al.* [47] publizierten Ergebnisse zeigen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass Cerulenin kein Substrat zur Inhibition benötigt. Es gibt mehrere mögliche Erklärungen dafür. Die erste Variante ist die Bildung einer instabilen, aktiven Konformation, die erst durch Bindung eines Substrats stabilisiert wird. Das aktive Zentrum wäre zumindest kurzzeitig offen und für somit für Cerulenin zugänglich. Die zweite Möglichkeit ist das Binden von Cerulenin an eine bestimmte SH-Gruppe an der Oberfläche von FXIII anstatt an das aktive Zentrum. Dabei müssen aber zwei Bedingungen erfüllt sein. Zunächst darf nur ein Cerulenin pro Monomer binden, wie dies mit der Massenspektrometrie bewiesen werden konnte (siehe Abb. 4.22). Außerdem muss diese Modifikation ausreichend für eine vollständige Inaktivierung sein, da keine Aktivität nach Bindung von Cerulenin messbar ist. Von den 9 vorhandenen Cysteinen kämen aufgrund der Lage nur Cys188 und Cys423 in Frage, wobei die letztgenannte Aminosäure nur schlecht zugänglich ist. Deshalb müsste Cerulenin, falls es nicht am aktiven Zentrum bindet, höchstwahrscheinlich an Cys188 koppeln.

In Abbildung 5.16 sind die Positionen der beiden angesprochenen Cysteine, des Cysteins im aktiven Zentrum (Cys314) sowie die Bereiche, die für die Substratbindung wichtig sein sollen, eingezeichnet. Dabei sind die von Achyutan *et al.* [95] vermuteten Substratbindungsstellen rot markiert. Unter der Voraussetzung, dass die markierten Bereiche wirklich für die Bindung des Substrats verantwortlich sind, könnte ein modifiziertes Cys188 durchaus die Bindung eines Substrats behindern. Allerdings befindet es sich 34 Å vom aktiven Zentrum entfernt. Im Berichrom Assay kommt aber nur ein relativ kleines Substrat zum Einsatz, so dass die Wahrscheinlichkeit eher gering ist, dass es durch die Bindung von Cerulenin an Cys188 zur vollständigen Inhibition kommt. Eine Bindung an Cys423 statt an Cys188 ist aufgrund der weniger exponierten Lage dieser Aminosäure unwahrscheinlich. Außerdem

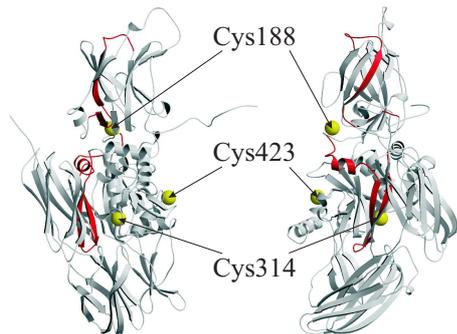


Abbildung 5.16: Mögliche Bindungspartner für Cerulenin und vermutete Bereiche der Substratbindung.

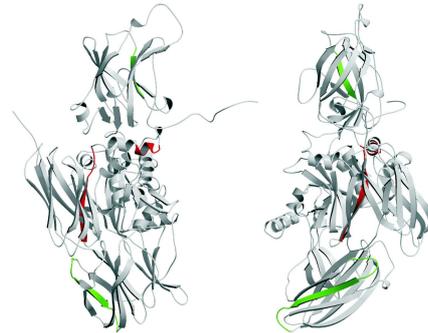


Abbildung 5.17: Die in [94] gefundenen Unterschiede zwischen FXIII und FXIIIa, wobei rot die in FXIIIa besser und grün die in FXIIIa schlechter zugänglichen Bereiche markiert sind.

liegt auch dieses Cystein knapp 30 Å vom aktiven Zentrum entfernt. Es deutet somit alles auf eine Bindung von Cerulenin am aktiven Zentrum hin.¹⁶

Wie bereits erwähnt, sind in Abb. 5.16 die Bereiche von FXIII markiert, die möglicherweise in die Substratbindung involviert sind. Im Einzelnen sind dies die Abschnitte Asn72–Asp97 und Asp190–Phe230. Zur Identifizierung dieser Bereiche wurden die entsprechenden Sequenzen als Peptide synthetisiert und in verschiedenen Aktivitätstests untersucht. Die Idee dahinter war, dass diese Peptide als Inhibitoren wirken, wenn sie mit dem Substrat interagieren und damit zu einem für die Substratbindung verantwortlichen Bereich gehören müssen. In einer ähnlichen Publikation wurde der Wasserstoff-Deuterium-Austausch als Maß für die Zugänglichkeit bestimmter Sequenzabschnitte genutzt [94]. Aus den unterschiedlichen Massen einzelner Peptide, die durch proteolytischen Verdau von FXIII bzw. FXIIIa erhalten wurden, konnte auf Strukturänderungen infolge der Aktivierung geschlossen werden. Signifikante Unterschiede wurden in den Bereichen Leu98–Val104, Ile220–Phe230, Tyr240–Met247 und Asn526–Arg546 gemessen. Dabei waren der erst- und der letztgenannte Bereich in der aktiven Form weniger exponiert als in der inaktiven Form (siehe Abb. 5.17). Die beiden Untersuchungen lassen in Kombination mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen Aussagen über FXIIIa zu. Die beobachtete Verlagerung von Domäne 3 (siehe Tabelle 5.6) wird durch die Deuterium-Untersuchungen bestätigt, auch wenn die Bewegung im Kristall natürlich nur der Beginn einer weitaus umfassenderen Verschiebung sein kann. Schließlich zeigen auch schon die Ergebnisse der TLS-Parameter, dass die Domänen 3 und 4 flexibler als die anderen beiden sind und auch am deutlichsten auf die Calciumbindung reagieren. Wie bereits von verschiedenen Autoren vermutet, geht die Aktivierung mit einer Öffnung der Kern-Domäne einher. Eine Bestätigung dafür findet sich im besseren Zugang zu Teilen dieser Domäne. Parallel dazu kommt es wahrscheinlich zu der bereits erwähnten Verlagerung der beiden C-terminal gelegenen Domänen. Interessant, aber leider noch nicht endgültig zu beantworten, ist die Frage, ob diese Strukturänderungen eine Folge oder eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Substratbindung sind.

Die nächste Fragestellung betrifft das Verhalten gegenüber Calciumionen. Es

¹⁶Eine Inhibition der Aktivität aufgrund einer Behinderung der notwendigen Konformationsänderung durch die modifizierten Cysteine ist zwar möglich, aber eine Diskussion darüber erscheint wegen des fehlenden Wissens um die Details einer solchen Strukturänderung wenig sinnvoll.

ist schon seit langem bekannt, dass sich eine FXIII-Lösung durch die Zugabe von Calciumionen eintrübt und das Präzipitat sich auch durch Zugabe von Wasser bzw. EDTA nicht wieder auflöst. Dass eine Bildung großer Aggregate durch die Bindung von Calciumionen ausgelöst wird, ist eher unwahrscheinlich. Es kommt daher offensichtlich schon bei geringen Calciumkonzentrationen zu einer Konformationsänderung, die aber nicht für eine Aktivierung ausreicht. Interessant ist dabei, dass auch eine Zugabe von Tridegin diese Trübung auslöst. Diese erfolgt ebenso plötzlich, nur dass es vorher eine mehrere Sekunden lange Verzögerung gibt. Seltsamerweise gibt es in den Kristallstrukturen keinen Anhaltspunkt für eine deutliche Änderung in der Struktur nach Zugabe von Calcium, der das beobachtete Verhalten erklären könnte. Erst bei sehr hohen Calcium-Konzentrationen kommt es zur Zerstörung des Kristalls (siehe Abb. 4.7). Hinzu kommt, dass die in der FXIII-Struktur gefundenen Calciumionen nicht als Verursacher einer solchen Konformationsänderung vorstellbar sind, weitere Calciumbindungsstellen aber ausgeschlossen werden können. Schließlich wurden nicht nur verschiedene Kristallformen untersucht, sondern auch auf Basis der anomalen Signale nach möglichen Bindungsstellen für Calciumionen gefahndet.

Zumindest über die Eigenschaften von FXIIIa ist einiges bekannt. Zunächst soll diese Struktur recht kompakt sein, wie in dem Beitrag von Turner *et al.* [94] nachzulesen ist. Begründet wird dies mit der geringen Anfälligkeit für einen Pepsin-Verdau. Aufgrund der Experimente zur Aktivierung und Aufkonzentration kann man weiterhin sagen, dass FXIIIa offensichtlich wesentlich instabiler ist als FXIII. Jede kleine Änderung in der Zusammensetzung des Lösungsmittels führte zur Bildung von Niederschlag. Im Laufe der Aktivierung werden offenbar vorübergehend hydrophobe Flächen exponiert. Anders ist der Bedarf an Detergenz nicht zu erklären. Auch folgende Beobachtung würde damit einen Sinn ergeben: Während der Aktivierung darf die Proteinkonzentration nicht zu hoch sein, da es sonst zu großen Verlusten in Form von Präzipitat kommt, anschließend kann aber eine Aufkonzentration erfolgen. Des Weiteren wird während der Aktivierung ein Detergenz benötigt. Nach Abschluss der Aktivierung sind aber vor allem Stabilisatoren, wie Glycerin und PEG gefragt. Dies ist ein weiteres Indiz für eine Instabilität der aktiven Konformation. Eine solche Eigenschaft hätte auch für den Organismus durchaus positive Seiten. Das Zymogen ist schließlich die Form, in der das Enzym gespeichert wird. FXIII sollte demnach möglichst stabil sein, um nicht ständig ohne besonderen Grund dieses Protein produzieren zu müssen. Die aktive Form dagegen darf nur kurzzeitig aktiv sein, weil sonst vermehrt unerwünschte Nebenreaktionen auftreten könnten. Idealerweise stabilisiert ein gebundenes Substrat¹⁷ das Enzym, damit es nach längerer Abwesenheit eines geeigneten Substrats inaktiv wird. Eine Ursache für die Instabilität könnte schon der Zerfall des Dimers in zwei Monomere sein.

Diese Gedanken stellen im Übrigen keinen Widerspruch zum Ergebnis des Stabilitätstests (siehe Abb. 4.37 auf Seite 65) dar. Bei diesem Test ging es um die Stabilität in 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 15 % Glycerin, 300 mM NaCl und 4 mM CHAPS — wahrlich keine physiologischen Bedingungen.

Vor diesem Hintergrund ist das Scheitern der Kristallisation nicht verwunderlich. Ein Absinken der zur Stabilisierung von FXIIIa zwingend notwendigen hohen Glycerinkonzentration durch das Mischen von Protein- und Reservoirolösung hatte ein sofortiges Präzipitieren eines Großteils des gelösten Proteins zur Folge. Man darf dieses Ereignis auch nicht mit dem beobachteten, leichten Niederschlag beim Züchten der monoklinen Kristallform gleichsetzen. Wahrscheinlich muss bei der Kristallisation von FXIIIa darauf geachtet werden, dass sich zunächst möglichst wenig Präzipitat bildet und anschließend dem Tropfen nur langsam Wasser entzo-

¹⁷Man beachte in diesem Zusammenhang, dass das natürliche Substrat in Form von Fibrinketten relativ groß ist und somit durchaus zur Stabilisierung beitragen kann.

gen wird. Leider konnte unter den getesteten Bedingungen nicht ein Ausgangspunkt für weitere Verfeinerungen gefunden werden, obwohl sehr umfangreiche Tests unternommen worden sind.

5.6 Ausblick auf weiterführende Arbeiten

Gibt es einen Weg, die Struktur der aktiven Konformation aufzuklären? Aufgrund der Größe des Proteins käme z. Z. nur eine Kristallisation in Frage. Diese war aber bisher nicht von Erfolg gekrönt. Führt man den Gedanken von der instabilen FXIIIa-Konformation konsequent weiter, so wäre wahrscheinlich eine Kombination aus stabilisierendem Substrat und irreversibel bindendem Inhibitor hilfreich. Die Synthese der Substratpeptide war ein Schritt in diese Richtung, aber noch nicht ausreichend.

Zunächst aber müssen weitere Experimente die aufgestellten Thesen untermauern. Es wäre zu beweisen, ob Cerulenin wirklich an das aktive Zentrum bindet. Der eleganteste Weg dafür führt über Mutationen der beiden angesprochenen Cysteine. Könnte z. B. eine C188A-Mutante nicht unter Anwendung des bisher genutzten Protokolls mit Cerulenin inaktiviert werden, wäre dies ein Beleg für eine Cerulenin-Bindung an diese Aminosäure. Eine weitere Möglichkeit stellt eine Massenbestimmung der C314A-Mutante nach Cerulenin-Behandlung dar. Außerdem fehlt noch der Beweis, dass FXIIIa unter physiologischen Bedingungen instabil ist und ein Substrat stabilisierend wirkt. Selbst die begonnenen Kristallisationsversuche könnten fortgesetzt werden und sich primär auf Abwandlungen der Bedingungen konzentrieren, unter denen FXIIIa in Lösung gehalten werden konnte. Letztendlich wäre auch ein Inhibitor auf Basis eines modifizierten Lysins hilfreich, um die Entstehung der Isoeptidbindung zu untersuchen.

Alle genannten Untersuchungen haben gemeinsam, dass sie viel Zeit, Material und Geduld des Experimentators benötigen, da nach den bisherigen Erfahrungen nur kleine Schritte gemacht werden können. Bei diesem Projekt ist zwar kein schneller Durchbruch zu erwarten, aber das endgültige Ergebnis, die Struktur der aktiven Form des Faktor XIII, sollte für all die Mühen entschädigen.

Kapitel 6

Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit wurden umfangreiche Untersuchungen der zellulären Form des Blutgerinnungsfaktors XIII präsentiert. Zunächst wurden drei verschiedene Kristallformen untersucht, wobei in zwei Fällen auch Komplexe mit Calcium bearbeitet wurden. Dabei heben sich die FXIII-Strukturen von den monoklinen Kristallen qualitativ deutlich von denen der orthorhombischen Form ab. Mit einer Auflösung von 1,6 Å übertrifft der auf Seite 35 beschriebene Komplex mit Calcium deutlich alle bisherigen Strukturen von Transglutaminasen. Aber auch die vier anderen Strukturen sind entweder gar nicht, oder nicht in dieser Qualität in der öffentlichen Datenbank zu finden. Nach Abschluss der Verfeinerungen wurden die Strukturen miteinander verglichen, um die strukturellen Unterschiede zu analysieren. Es wurden teilweise signifikante Differenzen aufgezeigt und diese für Vorhersagen in Bezug auf die aktive Konformation genutzt. So ergänzen z. B. die gefundene Verschiebung von Domäne 3 und deren Flexibilität bereits publizierte Ergebnisse über potentielle Strukturänderungen infolge einer Aktivierung.

Zur genauen Quantifizierung aller gebundenen Calciumionen dienten die anomalen Signale, die durch die Vermessung eines mit Calciumionen getränkten FXIII-Kristalls bei einer Wellenlänge von 2,6 Å erhalten wurden. Eine Auswertung ergab, dass neben den beiden bereits bekannten keine weiteren Bindungsstellen im Dimer vorhanden sind. Für die Güte der Ergebnisse spricht, dass außer den Calciumionen bis auf zwei in stark beweglichen Abschnitten gelegenen Schwefelatome alle anderen anhand ihrer anomalen Signale in der Differenzkarte identifiziert werden konnten. Und dies, obwohl Schwefel ein deutlich schwächeres Signal bei der verwendeten Wellenlänge besitzt.

Parallel zu der Arbeit an den verschiedenen FXIII-Strukturen wurden intensive Untersuchungen zur Aktivierung und Aufkonzentration der aktiven Form FXIIIa mit dem Ziel der Kristallisation unternommen. In zahlreichen Experimenten konnten die Methode der Aktivierung und die für die Kristallisation zwingend notwendige Aufkonzentration so verbessert werden, dass mit dem Suchen nach geeigneten Kristallisationsbedingungen begonnen werden konnte. Trotz einer Vielzahl von getesteten Bedingungen konnten keine FXIIIa-Kristalle erhalten werden. Auch eine Veränderung in der Zusammensetzung der Proteinlösung blieb ohne Erfolg. Die Ergebnisse lassen aber den Schluss zu, dass die aktive Konformation relativ instabil ist und deshalb nur schwierig zu kristallisieren ist.

Des Weiteren erfolgte eine Synthese von verschiedenen inhibitorischen Peptiden, die der Kokristallisation dienen sollten. Dabei handelte es sich um Varianten des im Aktivitätstest eingesetzten Substratpeptids. Es wurde das enthaltene Glutamin gegen vier verschiedene Aminosäuren (Alanin, Norvalin, Diaminobuttersäure und γ -Cyano- α -aminobuttersäure) ausgetauscht. Die so erhaltenen Inhibitoren wiesen

zwar keine überragenden Bindungskonstanten auf, gaben aber Aufschluss über die Substraterkennung des FXIII.

Insgesamt kann man festhalten, dass trotz der missglückten Kristallisation der aktiven Form FXIIIa und des Plasmafaktor XIII zahlreiche neue Erkenntnisse über den Blutgerinnungsfaktor XIII gewonnen werden konnten, die zum besseren Verstehen dieses besonderen Proteins beitragen.

Kapitel 7

Anhang

Die folgenden Abbildungen und Tabellen sollen die Arbeit ergänzen, wurden aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in die vorangegangenen Kapitel eingebunden.

Es sind dies im Einzelnen:

1. der Sequenzvergleich aller bekannten, humanen Transglutaminasen
2. der Sequenzvergleich von FXIIIB mit β_2 -Glykoprotein I

Literaturverzeichnis

- [1] J. Kuszewski, A.M. Gronenborn, and G.M. Clore. Improving the quality of NMR and crystallographic protein structures by means of a conformational database potential derived from structure databases. *Protein Science*, 5:1067–1080, 1996.
- [2] A. Yonath, J. Muessig, B. Tesche, S. Lorenz, V.A. Erdmann, and H.G. Wittmann. Crystallization of the large ribosomal subunit from *b. stearothermophilus*. *Biochem. Int.*, 1:428–435, 1980.
- [3] J. Harms, F. Schluenzen, R. Zarivach, A. Bashan, S. Gat, I. Agmon, H. Bartels, F. Franceschi, and A. Yonath. High resolution structure of the large ribosomal subunit from a mesophilic eubacterium. *Cell*, 107(5):679–688, 2001.
- [4] K. Laki and L. Lorand. On the solubility of fibrin clots. *Science*, 108:280, 1948.
- [5] N.K. Sarkar, D.D. Clarke, and H. Waelsch. An enzymatically catalyzed incorporation of amines into proteins. *Biochim. Biophys. Acta.*, 25:451–452, 1957.
- [6] S. Liu, R.A. Cerione, and J. Clardy. Structural basis of the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *PNAS*, 99:2743–2747, 2002.
- [7] D.M. Pinkas, P. Strop, A.T. Brunger, and Ch. Khosla. Transglutaminase 2 undergoes a large conformational change upon activation. *PLoS Biol.*, 5(12):e327, 2007.
- [8] B. Ahvazi, H.C. Kim, S.H. Kee, Z. Nemes, and P.M. Steinert. Threedimensional structure of the human transglutaminase 3 enzyme: binding of calcium ions changes structure for activation. *EMBO J.*, 21:2055–2067, 2002.
- [9] K. Noguchi, K. Ishikawa, K. Yokoyama, T. Ohtsuka, N. Nio, and E. Suzuki. Crystal structure of red sea bream transglutaminase. *J. Biol. Chem.*, 276:12055–12059, 2001.
- [10] T. Kashiwagi, K. Yokoyama, K. Ishikawa, K. Ono, D. Ejima, H. Matsui, and E. Suzuki. Crystal structure of microbial transglutaminase from *Streptococcus thermophilus*. *J. Biol. Chem.*, 277:44252–44260, 2002.
- [11] L. Buetow, G. Flatau, K. Chiu, P. Boquet, and P. Ghosh. Structure of the rho-activating domain of *e. coli* cytotoxic necrotizing factor 1. *Nature Structural Biology*, 8(7):584–588, 2001.
- [12] L. Muszbek, V.C. Yee, and Z. Hevessy. Blood coagulation factor XIII: Structure and function. *Thromb. Res.*, 94:271–305, 1999.
- [13] H. Yorifuji, K. Anderson, G.W. Lynch, L. Van de Water, and J. McDonagh. B protein of factor XIII: Differentiation between free B and complexed B. *Blood*, 72:1645–1650, 1988.

- [14] R.A.S. Ariens, H.P. Kohler, M.W. Mansfield, and P.J. Grant. Subunit antigen and activity levels of blood coagulation factor XIII in healthy individuals. *Arteriocler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19:2012–2016, 1999.
- [15] L.J. Weisberg, D.T. Shiu, P.R. Conkling, and M.A. Shuman. Identification of normal peripheral blood monocytes and liver as sites of synthesis of coagulation factor XIII A-chain. *Blood*, 70:579–582, 1987.
- [16] S. Ikematsu. An approach to the metabolism of factor XIII. *Acta Haematol. (Basel)*, 33:299–301, 1981.
- [17] J.A. Nagy, R.L. Kradin, and J. McDonagh. Biosynthesis of factor XIII A and B subunits. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 231:29–49, 1988.
- [18] R. Adany and M. Antal. Three different cell types can synthesize factor XIII subunit A in the human liver. *Thromb. Haemost.*, 76:74–76, 1996.
- [19] L. Lorand, J.M. Jeong, J.T. Radek, and J. Wilson. Human plasma factor XIII: Subunit interactions and activation of zymogen. *Methods Enzymol.*, 222:22–35, 1993.
- [20] M. Saito, H. Asakura, and T. Yoshida. A familial factor XIII subunit B deficiency. *Br. J. Haematol.*, 74:290–294, 1990.
- [21] H. Mikkola, M. Syrjälä, V. Rasi, E. Vahtera, E. Hämäläinen, L. Peletonen, and A. Palotie. Deficiency in the a-subunit of coagulation factor XIII: Two novel point mutations demonstrate different effects on transcript levels. *Blood*, 84:517–525, 1994.
- [22] T. Nishigaki, K. Omoto, and T. Juji. Genetic polymorphism of the a subunit of human coagulation factor XIII in Japanese. *Jap. J. Hum. Genet.*, 26:237–241, 1981.
- [23] I. Balogh, G. Szoke, L. Karpati, U. Wartiovaara, E. Katona, I. Komaromi, G. Haramura, G. Pfliegler, H. Mikkola, and L. Muszbek. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood*, 96:2479–2486, 2000.
- [24] R.A.S. Ariens, H. Philippou, C. Nagaswami, J.W. Weisel, D.A. Lane, and P.J. Grant. The factor XIII V34L polymorphism accelerates thrombin activation of factor XIII and affects cross-linked fibrin structure. *Blood*, 96:988–995, 2000.
- [25] S. Kangsadalampai and P.G. Board. The Val34Leu polymorphism in the A subunit of coagulation factor XIII contributes to the large normal range in activity and demonstrates that the activation peptide plays a role in catalytic activity. *Blood*, 92:2766–2770, 1998.
- [26] H.P. Kohler, R.A.S. Ariens, P. Whitaker, and P.J. Grant. A common coding polymorphism in the FXIII A-subunit gene (FXIIIVal34Leu) affects cross-linking activity. *Thromb. Haemost.*, 80:704, 1998.
- [27] A.J. Catto, H.P. Kohler, S. Bannan, M. Strickland, A. Carter, and P.J. Grant. Factor XIII Val 34 Leu: a novel association with primary intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 29:813–816, 1998.
- [28] A. Elbaz, O. Poirier, S. Canaple, F. Chedru, F. Cambien, and P. Amarenco. The association between the Val34Leu polymorphism in the factor XIII gene and brain infraction. *Blood*, 95:586–591, 2000.

- [29] H.P. Kohler, N.H. Stickland, N. Ossei-Gering, A. Carter, H. Mikkola, and P.J. Grant. Association of a common polymorphism in the factor XIII gene with myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, 79:8–13, 1998.
- [30] T.J. Hornyak, P.D. Bishop, and J.A. Shafer. alpha-Thrombin-catalyzed activation of human platelet factor XIII: Relationship between proteolysis and factor XIIIa activity. *Biochemistry*, 28:7326–7332, 1989.
- [31] C.G. Curtis, K.L. Brown, R.B. Curtis, R.A. Domanik, A. Gray, P. Stenberg, and L. Lorand. Calcium-dependent unmasking of active center cystein during activation of fibrin stabilizing factor. *Biochemistry*, 13, 18:3774–3780, 1974.
- [32] Y. Ando, S. Imamura, Y. Yamagata, A. Kitahara, H. Saji, T. Murachi, and R. Kannagi. Platelet factor XIII is activated by calpain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 144:484–490, 1987.
- [33] R.B. Credo, C.G. Curtis, and L. Lorand. Calcium-related regulatory function of fibrinogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 9:4234–4237, 1978.
- [34] C.S. Greenberg and C.C. Miraglia. The effect of fibrin polymers on thrombin catalyzed plasma factor XIII formation. *Blood*, 66:466–469, 1985.
- [35] C.S. Greenberg, K.E. Achyuthan, S. Rajagopalan, and S.V. Pizzo. Characterization of the fibrin polymer structure that accelerates thrombin cleavage of plasma factor XIII. *J. Clin. Invest.*, 75:1463–1470, 1985.
- [36] T.J. Hornyak and J.A. Shafer. Interactions of factor XIII with fibrin as substrate and cofactor. *Biochemistry*, 31:423–429, 1992.
- [37] M. Moaddel, D.H. Farrell, M.A. Daugherty, and M.G. Fried. Interactions of human fibrinogens with factor XIII: Roles of calcium and the γ' peptide. *Biochemistry*, 39:6698–6705, 2000.
- [38] M.W. Mosesson, J.S. Finlayson, and R.A. Umfleet. Human fibrinogen heterogeneities: Identification of chain variants. *J. Biol. Chem.*, 247:5223–5227, 1972.
- [39] J. Polgar, V. Hidasi, and L. Muszbek. Non-proteolytic activation of cellular protransglutaminase (placenta macrophage Factor XIII). *Biochem. J.*, 267:557–560, 1990.
- [40] L.C. Pedersen, V.C. Yee, P.D. Bishop, I. Le Trong, D.C. Teller, and R.E. Stenkamp. Transglutaminase factor XIII uses proteinase-like catalytic triad to crosslink macromolecules. *Prot. Sci.*, 3:1131–1135, 1994.
- [41] P.D. Bishop, G.W. Lasser, I. Le Trong, R.E. Stenkamp, and D.C. Teller. Human recombinant factor XIII from *saccharomyces cerevisiae*. crystallisation and preliminary x-ray data. *J. Biol. Chem.*, 265:13888–13889, 1990.
- [42] V.C. Yee, L.C. Pedersen, I. Le Trong, P.D. Bishop, R.E. Stenkamp, and D.C. Teller. Three-dimensional structure of a transglutaminase: Human blood coagulation factor XIII. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91:7296–7300, 1994.
- [43] R. Hilgenfeld, A. Liesum, R. Storm, H.J. Metzner, and H.E. Karges. Crystallization of blood coagulation factor XIII by an automated procedure. *FEBS Letters*, 265:110–112, 1990.
- [44] V.C. Yee, I. Le Trong, P.D. Bishop, L.C. Pedersen, R.E. Stenkamp, and D.C. Teller. Structure and function studies of factor XIIIa by x-ray crystallography. *Semin. Thromb. Hemostasis*, 22, 5:377–384, 1996.

- [45] M.S. Weiss, H.J. Metzner, and R. Hilgenfeld. Two non-proline *cis* peptide bonds may be important for factor XIII function. *FEBS Letters*, 423:291–296, 1998.
- [46] T. Sicker. Metallbindung, Aktivierung und Inhibierung von Blutgerinnungsfaktor XIII. Diplomarbeit, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 1999.
- [47] V.C. Yee, L.C. Pedersen, P.D. Bishop, R.E. Stenkamp, and D.C. Teller. Structural evidence that the activation peptide is not released upon thrombin cleavage of factor XIII. *Thromb. Res.*, 78:389–397, 1995.
- [48] B.A. Fox, V.C. Yee, L.C. Pedersen, I. Le Trong, P.D. Bishop, R.E. Stenkamp, and D.C. Teller. Identification of the calcium binding site and a novel ytterbium site in blood coagulation factor XIII by x-ray crystallography. *J. Biol. Chem.*, 274, 8:4917–4923, 1999.
- [49] T. Sicker and R. Hilgenfeld. Blutgerinnungsfaktor XIII: Aktivierung, Substrate und Struktur einer Transglutaminase. *Hämostaseologie*, 22:8–13, 2002.
- [50] N.A. Carrell, H.P. Erickson, and J. McDonagh. Electron microscopy and hydrodynamic properties of factor XIII subunits. *J. Biol. Chem.*, 264:551–556, 1989.
- [51] A.L. Shapiro. Molecular weight estimation of polypeptides by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis: further data concerning resolving power and general considerations. *Anal Biochem.*, 29:505–514, 1969.
- [52] R.B. Merrifield. *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149–2154, 1963.
- [53] K. Fickenscher, A. Aab, and W. Stüber. A photometric assay for blood coagulation factor XIII. *Thromb. Haemostas.*, 65:535–540, 1991.
- [54] W.H. Bragg and W.L. Bragg. The reflection of x-rays by crystals. *Proc. Roy. Soc.*, A38:428–438, 1913.
- [55] V. Schomaker and K.N. Trueblood. On the rigid-body motion of molecules in crystals. *Acta Cryst.*, B24:63–76, 1968.
- [56] G.S. Pawley. Further refinements of some rigid boron compounds. *Acta Cryst.*, 20:631–638, 1966.
- [57] G. Friedel. *Comptes Rendus Acad. Sci. Paris*, 157:1533–1536, 1913.
- [58] W.A. Hendrickson. Determination of macromolecular structures from anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Science*, 254:51–58, 1991.
- [59] R. Kronig and H.A. Kramers. *Z. Phys.*, 48:174, 1928.
- [60] A.T. Brünger. The free r value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*, 355:472–474, 1992.
- [61] G.N. Ramachandran and V. Sasisekharan. Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Prot. Chem.*, 23:283–437, 1968.
- [62] R.A. Laskowski, M.W. MacArthur, D.S. Moss, and J.M. Thornton. Procheck: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26:283–291, 1993.
- [63] J.M. Garcia-Ruiz, A. Morena, C. Viedma, and M. Col. Gel acupuncture methode. *Mater. Res. Bull.*, 28:541–546, 1993.

- [64] A.J.C. Wilson. The probability distribution of x-ray intensities. *Acta Cryst.*, 2:318–321, 1949.
- [65] T.R. Schneider. Objective comparison of protein structures: error scaled difference distance matrices. *Acta Cryst.*, D56:714–721, 2000.
- [66] T.R. Schneider. A genetic algorithm for the identification of conformationally invariant regions in protein molecules. *Acta Cryst.*, D58:195–208, 2002.
- [67] D.W. Cruickshank. Remarks about protein structure precision. *Acta Cryst.*, D55:583–601, 1999.
- [68] F. Courpet. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.*, 16:10881–10890, 1988.
- [69] P.J. Kraulis. Molscript: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 24:946–950, 1991.
- [70] E.A. Merritt and D.J. Bacon. Raster3D: Photorealistic molecular graphics. *Meth. Enzymol.*, 277:505–524, 1997.
- [71] G.H. Stout and L.H. Jensen. *X-ray Structure Determination. A Practical Guide*. Macmillan Publishing Co., Inc., 1968.
- [72] K. Diederichs and P.A. Karplus. Improved r-factors for diffraction data analysis in macromolecular crystallography. *Nature Struct. Biol.*, 4:269–275, 1997.
- [73] M.S. Weiss and R. Hilgenfeld. On the use of the merging r-factor as a quality indicator for x-ray data. *J. Appl. Cryst.*, 30:203–205, 1997.
- [74] W. Kabsch and C. Sander. Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers*, 22:2577–2637, 1983.
- [75] W. Kabsch. A solution for the best rotation to relate two sets of vectors. *Acta Cryst.*, A32:922–923, 1976.
- [76] O. Carugo and D. Bordo. How many water molecules can be detected by protein crystallography? *Acta Cryst.*, D55:479–483, 1999.
- [77] P.M. Kilby, L.J.V. Eldik, and G.C.K. Roberts. The solution structure of the bovine S100b protein dimer in the calcium-free state. *Structure*, 4(9):1041–1052, 1996.
- [78] M.M. Harding. The geometry of metal-ligand interactions relevant to proteins. *Acta Cryst.*, D55:1432–1443, 1999.
- [79] S. Chittalakkottu and V.C. Yee. Interaction of the Factor XIII activation peptide with α -thrombin. *J. Biol. Chem.*, 275:36942–36948, 2000.
- [80] S. Brennan and P.L. Cowan. A suite of programs for calculating x-ray absorption, reflection and diffraction performance for a variety of materials at arbitrary wavelengths. *Rev. Sci. Instrum.*, 63:850, 1992.
- [81] M.S. Weiss, T. Sicker, K. Djinovic-Carugo, and R. Hilgenfeld. On the routine use of soft x-rays in macromolecular crystallography. *Acta Cryst.*, D57:689–695, 2001.
- [82] M.S. Weiss and R. Hilgenfeld. Dehydration leads to phase transition in monoclinic factor XIII crystals. *Acta Cryst.*, D55:1858–1862, 1999.

- [83] S. Finney, L. Seale, R.T. Sawyer, and R.B. Wallis. Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XIIIa, from the blood-sucking leech *Haementeria ghilianii*. *Biochem. J.*, 324:797–805, 1997.
- [84] J.M. Hettasch and C.S. Greenberg. Analysis of the catalytic activity of human factor XIIIa by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, 269:28309–28313, 1994.
- [85] S.C. Gill and P.H. von Hippel. Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.*, 182:319–326, 1989.
- [86] J.G. Atkinson, J.J. Baldwin, D.A. Claremon, P.A. Friedman, D.C. Remy, and A.M. Stern. Factor XIII inhibitor compounds useful for thrombolytic therapy. Europäisches Patent Nr. EP0294016, 1988.
- [87] K.B. Lewis, D.C. Teller, J. Fry, G.W. Lasser, and P.D. Bishop. Crosslinking kinetics of the human transglutaminase, factor XIII[a2], acting on fibrin gels and gamma-chain peptides. *Biochemistry*, 36:995–1002, 1997.
- [88] B. Bouma, P.G. de Groot, J.M.H. van der Elsen, R.B.G. Ravelli, A. Schouten, M.J.A. Simmelink, R.H.W.M. Derksen, J. Kroon, and P. Gros. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure. *EMBO J.*, 18:5166–5174, 1999.
- [89] R. Schwarzenbacher, K. Zeth, K. Diederichs, A. Gries, G.M. Kostner, P. Laggner, and R. Prassl. Crystal structure of human β 2-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome. *EMBO J.*, 18:6228–6239, 1999.
- [90] B. Lee and F.M. Richards. The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility. *J. Mol. Biol.*, 55:379–400, 1971.
- [91] C. Chothia. Structural invariants in protein folding. *Nature*, 254:304–308, 1975.
- [92] M.D. Winn, M.N. Isupov, and G.N. Murshudov. Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Cryst.*, D57:122–133, 2001.
- [93] A.A. Vaguine, J. Richelle, and S.J. Wodak. SFCHECK: a unified set of procedures for evaluating the quality of macromolecular structure-factor data and their agreement with atomic model. *Acta Cryst.*, D55:191–205, 1999.
- [94] B.T. Turner and M.C. Maurer. Evaluating the roles of thrombin and calcium in the activation of coagulation factor XIII using H/D exchange and MALDI-TOF MS. *Biochemistry*, 41:7947–7954, 2002.
- [95] K.E. Achyuthan, T.F. Slaughter, M.A. Santiago, J.J. Enghild, and C.S. Greenberg. Factor XIIIa-derived peptides inhibit transglutaminase activity. *J. Biol. Chem.*, 268:21284–21292, 1993.

Abkürzungen und Synonyme

AS	Aminosäure
B-Faktor	Temperaturfaktor
β OG	β -Octylglucosid
BSA	Rinderserumalbumin
CMC	critical mycell concentration
CHAPS	N-Dodecyl-N,N-Dimethyl-3-amino-1-propansulfonat
Dab	Diaminobuttersäure (Strukturformel siehe Seite 68)
DIEA	Diethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DMC	Dichlormethan
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation
FPLC	Fast Performance Liquid Chromatography (schnelle Flüssigchromatographie)
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
FXIII	Faktor XIII
FXIIIa	aktiver Faktor XIII
FXIIIA	A-Untereinheit von Faktor XIII
FXIIIB	B-Untereinheit von Faktor XIII
FXIII _m	FXIII in der monoklinen Kristallform
FXIII _o	FXIII in der orthorhombischen Kristallform
FXIII _{oca}	FXIII im Komplex mit Calciumionen in der orthorhombischen Kristallform
Gln	γ -Cyano- α -aminobuttersäure (Strukturformel siehe Seite 68)
HBTU	(O-Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphat
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungsflüssigchromatographie)
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionisation
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
NADH	Nicotinamidadeninnucleotid
NMR	nuclear magnetic resonance
Nva	Norvalin (Strukturformel siehe Seite 68)
PEG	Polyethylenglycol
PPACK	H-D-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon
R _{free}	freier R-Faktor
R _{pim}	precision-indicating merging R-factor
R _{rim}	redundancy-independent merging R-factor
rms	root means square
rmsd	root means square diviation
SDS	sodium dodecylsulfat/Natriumdodecylsulfat
TFA	Trifluoressigsäure
w/v	weight per volume, Gewicht pro Volumen

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle steht Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld, der mich schon frühzeitig für die Schönheit der Proteinstrukturen begeisterte und meinen Blick auf die Röntgenkristallographie lenkte. Nicht zu vergessen, dass er es mir auch überhaupt erst ermöglichte die hier vorliegende Arbeit zu erstellen und sogar selbst mit der Beschreibung der Kristallisationsbedingungen von Faktor XIII den Grundstein für diese Studien legte.

Direkt im Anschluss sollen alle meine Mitarbeiter aus der Zeit am IMB Jena genannt sein. Sie alle waren eine große Hilfe wann immer ich welche brauchte. Aber zweifellos war einer von ihnen von herausragender Bedeutung: Dr. Manfred S. Weiss. Sein unbändiger Optimismus, seine Ausdauer und sein Können waren mir stets ein Vorbild. Und von keinem anderen habe ich wohl mehr über Röntgenkristallographie gelernt.

Schließlich wären da noch all die anderen helfenden Hände zu nennen. So z. B. Dr. H.J. Metzner, der mir freundlicherweise große Mengen Faktor XIII zu Verfügung stellte, Dr. Johannes Stöckel, der mir mit Rat und Tat beim Kampf gegen FXIIIa zur Seite stand und Dr. Torsten Steinmetzer, der mir bei der Herstellung der Peptide eine große Hilfe war.

Besonders danke ich aber meiner Familie, die viele Jahre Verständnis für den chronischen Zeitmangel aufbringen musste und mir trotzdem immer wieder den Rücken stärkte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die derzeit geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät bekannt ist, ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und nur die genannten Hilfsmittel und angegebenen Quellen verwendet habe. Des Weiteren wurde diese Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und auch keine Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen.

Leipzig, den 20. Dezember 2008

Tom Sicker