

**Die N-terminale Domäne von  
Heparinkofaktor II:  
Konformation und Bedeutung für die  
Hemmung von Thrombin**

Genehmigte

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld

vorgelegt von

**Dipl.-Chem. Ralf Eckert**

Bielefeld, 2005

*„Nicht die Genialen, die Zähne erreichen ihr Ziel.“*

# Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Genetik“ der Technischen Fakultät der Universität Bielefeld unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Ragg angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Ragg für die Möglichkeit der Dissertation, die gute wissenschaftliche Betreuung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. E. Flaschel, Leiter des Lehrstuhls Fermentationstechnik, danke ich für die Bereitschaft zur Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Frau Dr. Katherina Stembera (Fakultät für Chemie, Organische Chemie III) möchte ich mich für die Hilfe bei der Durchführung der Oberflächenplasmonresonanz-Studien bedanken.

Frau Dr. Regina Plessow (Fakultät für Chemie, Physikalische Chemie I) danke ich für die Durchführung der fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen.

Ich danke allen aktiven und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppen „Zelluläre Genetik“ und „Zellkulturtechnik“ für ihre Hilfsbereitschaft und die kollegiale und motivierende Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Dipl.-Biochem. Mareke Oley, Herrn Dr. Olaf Krüger und Herrn Dr. Ulf Tödtmann bedanken, die durch ihre Korrekturen des Manuskripts zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, insbesondere meinem Vater für seine Unterstützung, die er mir stets hat zukommen lassen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden vorab wie folgt publiziert:

Brinkmeyer S, **Eckert R**, Ragg H (2004)

Reformable intramolecular cross-linking of the N-terminal domain of heparin cofactor II: effects on enzyme inhibition.

European Journal of Biochemistry, 271, 4275-4283.

**Eckert R**, Ragg,H (2003)

Zinc ions promote the interaction between heparin and heparin cofactor II.

FEBS Letters, 541, 121-125.

Brinkmeyer S, **Eckert R**, Ragg H (2001)

Evidence for allosteric activation of heparin cofactor II in the presence of heparin or dermatan sulfate.

Thrombosis and Haemostasis, 86, P2082.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1	Serpine	3
2.1.1	Struktur und Konformation der Serpine	4
2.1.2	Hemmung von Serinproteasen durch inhibitorische Serpine	6
2.1.3	Der Verlauf der Reaktion von Serinproteasen mit inhibitorischen Serpinen	8
2.2	Heparinkofaktor II	10
2.2.1	Eigenschaften und Struktur von Heparinkofaktor II	10
2.2.2	Glykosaminoglykan-Bindung von HCII	12
2.2.3	Mechanismus der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin durch HCII	14
2.3	Glykosaminoglykane	20
2.4	Physiologie von HCII	22
2.5	Ziele der Arbeit	24
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>26</b>
3.1	Mikrobiologische Methoden	26
3.1.1	Bakterienstämme und Nährmedien	26
3.1.2	Kultivierung und Lagerung von prokaryotischen Zellen	27
3.1.3	Herstellung transformationskompetenter Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan	27
3.1.4	Transformation von Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan mit CaCl <sub>2</sub>	28
3.2	Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1	Agarosegelelektrophorese	29
3.2.2	DNA-Isolierung und Reinigung	30
3.2.2.1	Plasmid-Schnell-Charakterisierung	30
3.2.2.2	Plasmidisolierung mittels Quantum Prep <sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit	30
3.2.2.3	Plasmidisolierung mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit	30
3.2.2.4	DNA-Isolierung mittels QIAGEN Gel Extraction Kit	31
3.2.2.5	DNA-Isolierung mittels QIAquick PCR Purification Kit	31
3.2.2.6	Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels ethanolischer Fällung	31

---

3.2.3	DNA-Konzentrationsbestimmung . . . . .	32
3.2.4	Restriktionsspaltung . . . . .	32
3.2.5	Dephosphorylierung von DNA . . . . .	33
3.2.6	Ligation . . . . .	34
3.2.7	Konstruktion der Expressionsvektoren . . . . .	34
3.3	Zellkultivierung . . . . .	37
3.3.1	Zelllinien und Kulturmedien . . . . .	37
3.3.2	Stammhaltung und Zellpassagierung . . . . .	39
3.3.3	Kryokonservierung und Trypanblau-Ausschlussfärbung . . . . .	40
3.3.4	Transfektion tierischer Zellen mittels Lipofektion . . . . .	41
3.3.5	Darstellung stabil exprimierender CHO-Zelllinien . . . . .	42
3.4	Proteinchemische Methoden . . . . .	44
3.4.1	Protein-Quantifizierung . . . . .	44
3.4.1.1	ELISA . . . . .	44
3.4.1.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen . . . . .	45
3.4.2	Elektrophoretische Verfahren . . . . .	46
3.4.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese . . . . .	46
3.4.2.2	Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung . . . . .	48
3.4.3	Western-Blot . . . . .	48
3.4.3.1	Elektrotransfer . . . . .	49
3.4.3.2	Immunologische Detektion . . . . .	49
3.4.4	Alkylierung von rekombinantem HCII . . . . .	50
3.4.5	Reduktion und Reoxidation von rekombinantem HCII . . . . .	51
3.4.6	Behandlung von Dermatansulfat mit Natriumnitrit . . . . .	52
3.5	Chromatographie . . . . .	53
3.5.1	Fast-Performance-Liquid-Chromatographie . . . . .	53
3.5.1.1	Affinitätschromatographie . . . . .	54
3.5.1.2	Anionentauscherchromatographie . . . . .	56
3.6	Isolierung und Reinigung von HCII aus humanem Plasma . . . . .	57
3.6.1	Proteinfällungen mit PEG 8000 und BaCl <sub>2</sub> . . . . .	57
3.6.2	Chromatographische Isolierung . . . . .	58
3.7	Darstellung einer Immunoaffinitätsmatrix . . . . .	60
3.7.1	Isolierung monospezifischer Antikörper gegen HCII aus Serum . . . . .	60
3.7.2	Chemische Kopplung eines anti-human-HCII Antikörpers an rProtein-A . . . . .	62
3.8	Isolierung von rHCII-Varianten aus Zellkulturen . . . . .	63
3.8.1	Konzentrierung über Ionenaustauschchromatographie . . . . .	63
3.8.2	Immunoaffinitätsreinigung von rHCII . . . . .	64
3.8.3	Dialyse und Produktkonzentrierung . . . . .	65
3.9	Analytik . . . . .	66
3.9.1	Komplexierung von HCII mit $\alpha$ -Thrombin . . . . .	66
3.9.2	Heparin-Affinitätschromatographie in Gegenwart bivalenter Kationen . . . . .	67
3.9.3	Metallionen-Affinitätschromatographie von Plasma-HCII . . . . .	68
3.9.4	Oberflächenplasmonresonanz . . . . .	69
3.9.4.1	Immobilisierung von biotinyliertem Heparin . . . . .	71
3.9.4.2	Bindung der Analyten an einem Heparin-modifizierten Biochip . . . . .	72

3.9.5	Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES) . . . . .	73
3.9.5.1	Aufbau des AES-Detektionssystems . . . . .	74
3.9.5.2	Messung der intrinsischen Fluoreszenz von HCII und ATIII . . . . .	74
3.9.6	Bestimmung von Reaktionskinetiken zweiter Ordnung . . . . .	77
3.9.6.1	Kinetische Bestimmung der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin . . . . .	78
3.9.6.2	Kinetische Bestimmung der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart bivalenter Kationen . . . . .	79
3.9.7	Kinetische Bestimmung der Hemmung von $\alpha$ -Chymotrypsin . . . . .	80
3.9.8	Bestimmung der operativen Molarität von $\alpha$ -Thrombinlösungen . . . . .	81
3.9.9	Bestimmung der Stöchiometrie der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin durch HCII . . . . .	83
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>85</b>
4.1	Produktion von HCII aus humanem Plasma . . . . .	85
4.1.1	Isolierung und Reinigung . . . . .	85
4.2	Heparininteraktion von HCII in Gegenwart divalenter Kationen . . . . .	89
4.2.1	Bestimmung der relativen Heparinaffinität im chromatographischen System . . . . .	90
4.2.1.1	Relative Heparinaffinität von HCII . . . . .	90
4.2.1.2	Relative Heparinaffinität des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes . . . . .	93
4.2.2	Bindungsstudien von HCII an immobilisiertem Heparin . . . . .	95
4.2.2.1	Kontrolle der Funktionalität des Biochips . . . . .	95
4.2.2.2	Interaktion von HCII mit Heparin in Gegenwart divalenter Kationen . . . . .	97
4.2.2.3	Interaktion von HCII mit Heparin in Abhängigkeit der $Zn^{2+}$ -Konzentration . . . . .	98
4.2.2.4	Interaktion von HCII und ATIII mit immobilisiertem Heparin . . . . .	100
4.2.2.5	Quantitative Bestimmung der Assoziation von HCII und ATIII an Heparin . . . . .	102
4.3	Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) . . . . .	105
4.4	Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES) . . . . .	107
4.4.1	Intrinsische Fluoreszenz von HCII. . . . .	107
4.4.2	Intrinsische Fluoreszenz von HCII in Gegenwart zweiwertiger Kationen . . . . .	108
4.4.3	Intrinsische Fluoreszenz von HCII und ATIII in Gegenwart von Zinkionen . . . . .	109
4.4.4	Quantitative Bestimmung der HCII/Zink-Interaktion . . . . .	111
4.5	Einfluss von Zinkionen auf die Kinetik der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin . . . . .	113
4.5.1	Bestimmung von Reaktionskonstanten der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin . . . . .	113
4.5.2	Bestimmung des SI-Wertes der HCII/ $\alpha$ -Thrombininhibition . . . . .	115
4.6	Darstellung einer Anti-HCII-Affinitätsmatrix . . . . .	117
4.6.1	Isolierung und Reinigung von Anti-HCII-Immunglobulinen aus Serum . . . . .	118
4.6.2	Immobilisierung und Kopplung der Anti-HCII-Antikörper an rProtein A . . . . .	119
4.7	Plasmidkonstruktionen für die eukaryotische Expression . . . . .	120
4.7.1	Konstruktion von Expressionsplasmiden . . . . .	120
4.8	Produktion von rHCII-Varianten in Zellkulturen . . . . .	123
4.8.1	Etablierung stabil exprimierender CHO-Zelllinien und Produktion von rHCII-Varianten . . . . .	123
4.8.2	Nachweis von rHCII in Kulturüberständen. . . . .	125
4.8.3	Isolierung und Reinigung von rHCII-Varianten aus Kulturüberständen . . . . .	126
4.9	Nachweis intramolekularer Disulfidbrücken und Reoxidation von rHCII-Varianten <i>in vitro</i> . . . . .	129

---

4.10	Reaktionsverhalten der rHCII-Varianten gegenüber den Proteasen $\alpha$ -Thrombin und $\alpha$ -Chymotrypsin . . . . .	132
4.10.1	Hemmung von $\alpha$ -Chymotrypsin . . . . .	132
4.10.2	Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen . . . . .	134
4.10.3	Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Anwesenheit von Glykosaminoglykanen . . . . .	136
4.10.3.1	Inhibitionskonstanten zweiter Ordnung in Abhängigkeit der Glykosaminoglykankonzentration . . . . .	139
4.10.3.2	Bestimmung der SI-Werte der $\alpha$ -Thrombininhibition . . . . .	141
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>145</b>
5.1	Darstellung von HCII . . . . .	146
5.1.1	Reinigung von humanem HCII aus Plasma . . . . .	146
5.1.2	Produktion und Reinigung von rekombinanten HCII-Varianten . . . . .	147
5.2	Zinkionen beeinflussen die Konformation von HCII und unterstützen die Interaktion zwischen HCII und Heparin . . . . .	148
5.2.1	Metallionenbindung von HCII . . . . .	148
5.2.2	Heparinbindung von HCII . . . . .	149
5.2.3	Heparinbindung von HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexen . . . . .	153
5.2.4	Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Zinkionen . . . . .	155
5.2.5	Zusammenfassende Betrachtung zur möglichen Bedeutung der Zinkionenbindung von HCII . . . . .	158
5.3	Strukturelle Änderungen von HCII unter Beteiligung der N-terminalen Domäne unterstützen die effektive Inhibition von $\alpha$ -Thrombin . . . . .	162
5.3.1	Analyse der reoxidierbaren Disulfidbrücken . . . . .	162
5.3.2	Analyse des Inhibitionsverhalten der rekombinanten HCII-Varianten . . . . .	164
5.3.2.1	Beleg für die Funktionalität der rekombinanten HCII-Varianten . . . . .	164
5.3.2.2	Inhibitionsverhalten der HCII-Varianten gegenüber $\alpha$ -Thrombin . . . . .	165
5.3.2.3	Einflüsse der geänderten Aminosäuresequenzen auf die Inhibitionseigenschaften der HCII-Varianten . . . . .	169
5.3.3	Zusammenfassende Betrachtung zum Einfluss der N-terminalen Domäne von HCII auf die Hemmung von $\alpha$ -Thrombin . . . . .	175
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>177</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>212</b>
7.1	Materialienverzeichnis . . . . .	212
7.2	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	213
7.1.1	Allgemeine Abkürzungen . . . . .	213
7.1.2	Aminosäuren . . . . .	215
7.3	cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII (wt) . . . . .	215

# Kapitel 1

## Zusammenfassung

Heparinkofaktor II (HCII) gehört zur Gruppe der Serinprotease-Inhibitoren (Serpine) und ist durch die Regulation der Protease Thrombin an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Die Hemmung von Thrombin durch HCII erfolgt durch die Bildung eines stabilen stöchiometrischen (1:1) Komplexes. Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen  $\alpha$ -Thrombin und HCII wird durch Glykosaminoglykane wie Heparin, Heparansulfat oder Dermatansulfat um mehr als 1000-fach erhöht. Dieser reaktionsbeschleunigende Effekt von Glykosaminoglykanen wird durch zwei unterschiedliche Modellvorstellungen erklärt: dem allosterischen Verdrängungs- und dem Doppelbrücken-Mechanismus. Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen und Experimente zur Struktur des nativen HCII-Moleküls und zum Reaktionsmechanismus von HCII, insbesondere zur Bedeutung des N-Terminus des Inhibitor-moleküls.

Biochemische (Heparin-Sepharose-Chromatographie) und biophysikalische (Oberflächenplasmonresonanz) Untersuchungen belegten, dass Zinkionen und im geringeren Maße auch Kupfer- und Nickelionen in der Lage sind, die Bindung zwischen HCII und Heparin zu verstärken. Die Metallionen-Affinitätschromatographie zeigte, dass HCII Zinkionen bindet. Durch Messung der intrinsischen Proteinfluoreszenz konnte belegt werden, dass diese Bindung eine Änderung der Struktur im HCII-Molekül induziert. Eine Möglichkeit zur Interpretation der Daten ist, dass die Zinkionen an den negativ geladenen Bereich der N-terminalen Domäne binden und die intramolekulare Bindung des N-Terminus an die  $\alpha$ -Helix D von HCII schwächen. Diese schwächere intramolekulare Bindung an die Glykosaminoglykan-Bindestelle ist auch eine Erklärungsmöglichkeit für die verstärkte Interaktion zwischen HCII und Heparin in Gegenwart von Zinkionen. Auch *in vivo* könnten Zinkionen Konformationsänderungen am HCII verursachen, die die Interaktion des Serpins mit Glykosaminoglykanen fördert.

Als weiterer Ansatz zur Ermittlung der Funktion und Position des N-Terminus von HCII wurden HCII-Varianten untersucht, die neu eingeführte Cysteine enthielten. Über diese Cysteine wurde der N-Terminus über die Ausbildung einer Disulfid-Verknüpfung kovalent am globulären Proteinkern fixiert. Es konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne reversibel über drei verschiedene Positionen mit der Position 195 des Proteinkerns in der Verbindungsschleife zwischen  $\alpha$ -Helix D und Strang 2 von  $\beta$ -Faltblatt A gebunden werden kann. Der Befund zeigt, dass der N-Terminus variabel an diesen Bereich binden kann und dieser Bereich als Ort einer intramolekularen Bindung des N-Terminus dient. Die kovalente Fixierung des N-Terminus am Proteinkern hatte keine wesentliche Auswirkung auf die Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin. Diese Ergebnisse zeigen, dass die gentechnisch erzeugten HCII-Varianten biologisch aktiv und die reaktiven Schleifen der Varianten für Zielproteasen zugänglich sind. Demgegenüber verursacht die Fixierung der N-terminalen Domäne eine Verringerung der inhibitorischen Aktivität von HCII gegenüber  $\alpha$ -Thrombin um bis zu 3600-fach. Die Reduktion der Disulfidbrücken und Alkylierung der Cysteine stellte die Aktivität der HCII-Varianten gegenüber  $\alpha$ -Thrombin wieder vollständig her. Die erhaltenen Daten demonstrieren, dass eine freie Beweglichkeit des N-Terminus von HCII eine notwendige Bedingung für die effektive Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin darstellt. Konformationsänderungen am HCII im Verlauf der Translokation der N-terminalen Domäne haben möglicherweise auch eine Wirkung auf die reaktive Schleife des Serpins und sind ein wichtiger Bestandteil der Interaktion zwischen dem Inhibitor und  $\alpha$ -Thrombin. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stehen im Einklang mit dem allosterischen Verdrängungsmechanismus und zeigen die Bedeutung der Konformation von HCII für die Hemmung von Thrombin. Zudem wurden Hinweise auf die Position des N-Terminus am globulären HCII erhalten. Die Ergebnisse erweitern das Verständnis über die molekularen Vorgänge bei der Aktivierung von HCII durch Glykosaminoglykane und bieten zudem neue Ansätze zur Entwicklung pharmakologisch relevanter HCII-Aktivatoren.

# Kapitel 2

## Einleitung

### 2.1 Serpine

Serpine (Serinprotease-Inhibitoren) bilden eine der größten Klassen von Protease-Inhibitoren in höheren Organismen. Serpine bilden eine Superfamilie von Proteinen, die an einer Vielzahl von bedeutenden physiologischen Prozessen beteiligt sind. Ihr Name leitet sich von der Eigenschaft der meisten Serpine ab, spezifische Serinproteasen zu inhibieren<sup>1</sup>. Bislang konnten ca. 500 unterschiedliche Serpine in höheren Vertebraten, Pflanzen, Prokaryoten und Viren identifiziert werden<sup>2</sup>. Im humanen Plasma stellen Serpine nahezu 10 % der gesamten Plasmaproteine und sind an der Regulation von verschiedenen Prozessen wie Blutgerinnung, Fibrinolyse und an Entzündungsreaktionen beteiligt<sup>3</sup>.

Die Evolution der Serpine erfolgte über einen Zeitrahmen von mindestens 500 Millionen Jahren. Es wird angenommen, dass sich die Serpin-Superfamilie durch inter- und intrachromosomale Genduplikation und Gendiversifikation entwickelt hat<sup>4</sup>. Dies führte in Vertebraten zur Bildung verschiedener Serpinklassen, die sich je nach Klassifikationssystem in 16<sup>5</sup> oder sechs<sup>6</sup> Familien einordnen lassen.

Die meisten Serpine sind Inhibitoren von Serinproteasen, doch wurden auch Serpine identifiziert, die Cysteinproteasen hemmen. Neben Protease-hemmenden Serpinen gibt es auch zahlreiche nicht-inhibierende Serpine. Diese Serpine besitzen die gleiche charakteristische Grundstruktur, haben aber eine andere Funktion, z.B. als Transportproteine

---

<sup>1</sup> Carrell & Travis, 1985

<sup>2</sup> Brandt *et al.*, 1990; Buller & Palumbo, 1991; Komiyama *et al.*, 1994; Whisstock *et al.*, 1999; Irving *et al.*, 2002; van Gent *et al.*, 2003

<sup>3</sup> Gils & Declercq, 1998; Huntington *et al.*, 2000<sup>b</sup>; Silverman *et al.*, 2001

<sup>4</sup> Hunt & Dayhoff, 1980

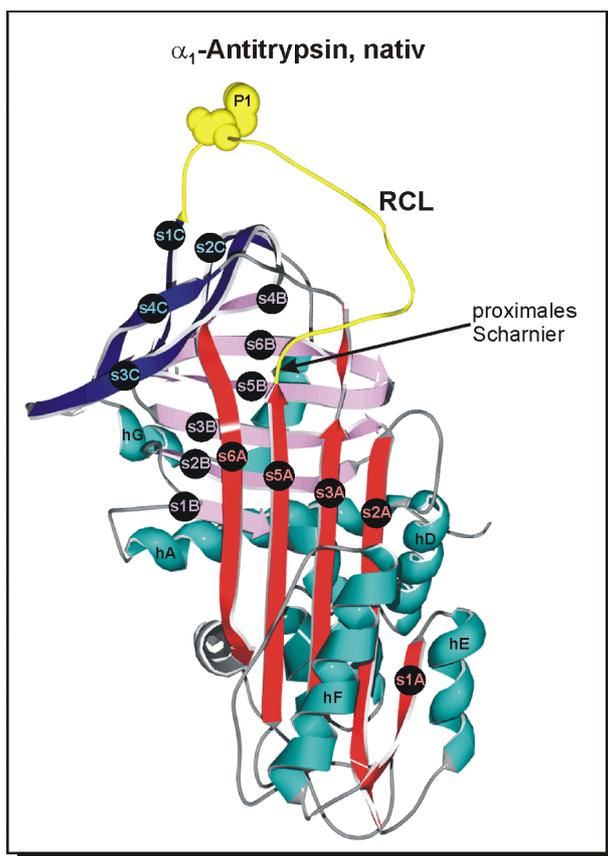
<sup>5</sup> Irving *et al.*, 2000

<sup>6</sup> Ragg *et al.*, 2001

von lipophilen Verbindungen oder sie sind an der zellulären Signaltransduktion beteiligt. So dienen das Cortison-bindende Globulin und das Thyroxin-bindende Globulin als Transportproteine für Hormone<sup>1</sup>. Angiotensinogen ist die Vorstufe eines Peptidhormons und ist bei der Regulation des Blutdrucks von Bedeutung<sup>2</sup>. Das *Heat Shock Protein* HSP 47 fungiert als *Chaperon* und hat eine unterstützende Funktion bei der Proteinfaltung<sup>3</sup>.

### 2.1.1 Struktur und Konformation der Serpine

Serpine bestehen aus einer singulären Peptidkette mit einer Grundstruktur aus bis zu 480 Aminosäuren, die N-terminale oder C-terminale Erweiterungen aufweisen kann<sup>4</sup>. Obwohl die Identität der Aminosäuresequenz bei den Mitgliedern der Serpin-Familie nicht sehr hoch ist und teilweise lediglich 30 % beträgt<sup>5</sup>, weisen alle Serpine eine hoch konservierte Tertiärstruktur auf. Viele Serpine sind glykosyliert und/oder tragen andere post-translationale Modifikationen.



**Abbildung 2.1-1:** Darstellung der Grundstruktur der Serpine am Beispiel von  $\alpha_1$ -Antitrypsin (PDB ID 1HP7<sup>6</sup>). Die reaktive Schleife (RCL) ist in gelb dargestellt mit der Position P1 (Methionin) des reaktiven Zentrums (Kalottendarstellung). Weitere Sekundärstrukturen sind das  $\beta$ -Faltblatt A (rot) mit fünf Strängen,  $\beta$ -Faltblatt B (magenta) mit sechs Strängen und das  $\beta$ -Faltblatt C (blau) mit vier Strängen. Die  $\alpha$ -Helices (hA, hD – hG) sind in grün abgebildet (weitere  $\alpha$ -Helices hB, hC, hI sind verdeckt). Das proximale Scharnier (*hinge region*) ist bei der Exposition der reaktiven Schleife von Bedeutung.

<sup>1</sup> Hammond *et al.*, 1987

<sup>2</sup> Janciauskiene, 2001

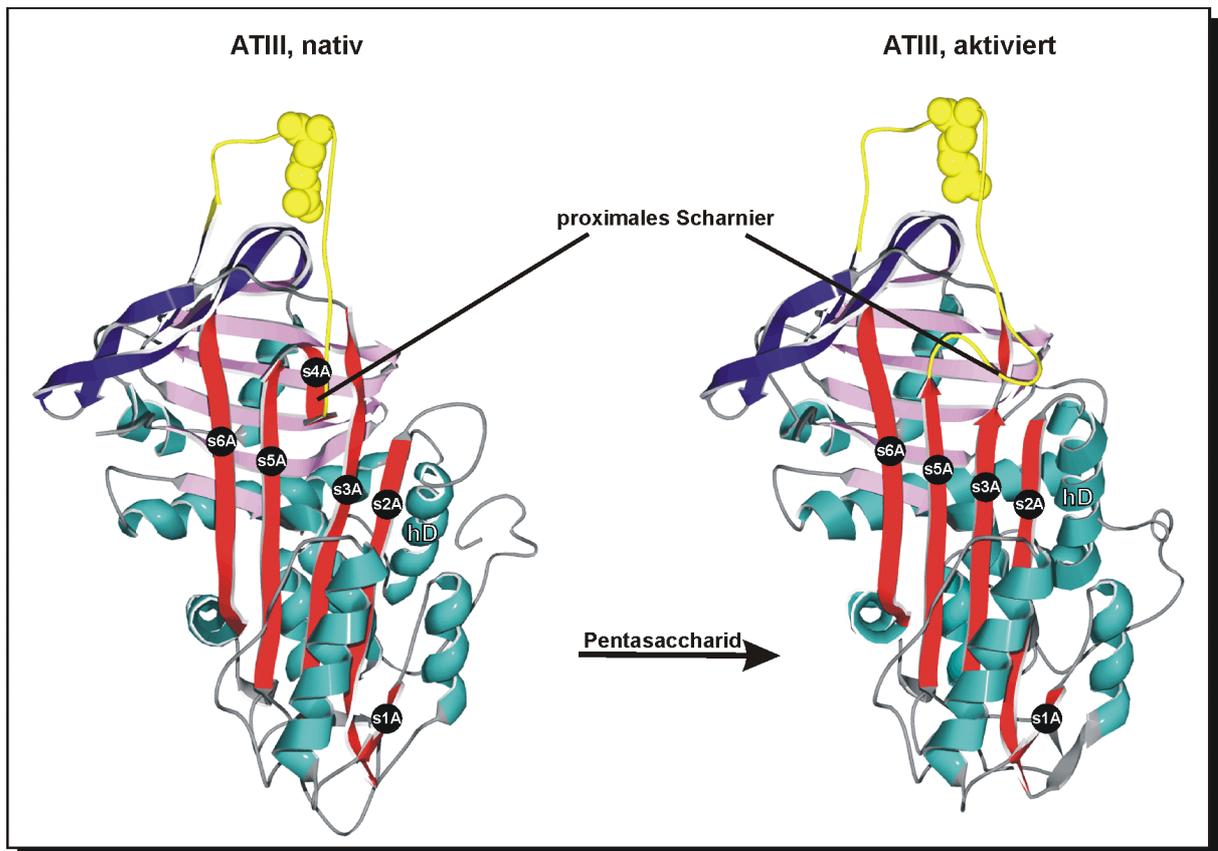
<sup>3</sup> Hirayoshi *et al.*, 1991

<sup>4</sup> Huber & Carrell, 1989

<sup>5</sup> Carrell & Travis, 1985

<sup>6</sup> Kim *et al.*, 2001

Die konservierte Tertiärstruktur der Serpine besteht aus drei  $\beta$ -Faltblattstrukturen (sA - sC) und sieben bis neun  $\alpha$ -Helices (hA - hI). Inhibitorische Serpine besitzen ein reaktives Zentrum, das etwa 30 bis 40 Aminosäuren vom C-terminalen Ende des Proteins entfernt ist (siehe Abbildung 2.1-1). Dieses Zentrum befindet sich an exponierter Stelle innerhalb einer Schleifenstruktur (*reactive centre loop, RCL*) von ca. 17 Aminosäuren und enthält die Spaltstelle für die Zielprotease des Serpins<sup>1</sup>. Die die Spaltstelle direkt flankierenden Aminosäuren werden als P1 und P1' bezeichnet<sup>2</sup>. Ausgehend von dieser Spaltstelle werden weitere Aminosäuren in N-terminaler Richtung mit P2, P3, usw. bezeichnet. Aminosäuren in Richtung des Carboxyterminus werden mit P2', P3', usw. gekennzeichnet.



**Abbildung 2.1-2:** Bänderdiagramme der Strukturen von nativem ATIII und Pentasaccharid-aktiviertem ATIII (PDB ID 2ANT<sup>3</sup> und 1AZX<sup>4</sup>). Die Elemente der Sekundärstrukturen entsprechen denen des in Abbildung 2.1-1 beschriebenen  $\alpha_1$ -Antitrypsins mit der Position P1 (Arginin) als Kalottendarstellung. Die Bindung eines Heparin-Pentasaccharids induziert unter anderem Konformationsänderungen am proximalen Scharnier, zwischen der reaktiven Schleife (gelb) und dem  $\beta$ -Faltblatt A (rot). Dies führt zu einer Expulsion der reaktiven Schleife und einer besseren Zugänglichkeit der Spaltstelle zwischen P1 und P1'. Die Struktur des RCL in Lösung, insbesondere die Orientierung der P1-Position nach Aktivierung, wird kontrovers diskutiert<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Johnson & Travis, 1977; Gils & Declerck, 1998

<sup>2</sup> Schechter & Berger, 1967

<sup>3</sup> Carrell *et al.*, 1994; Skinner *et al.*, 1997

<sup>4</sup> Jin *et al.*, 1997

<sup>5</sup> Dementiev *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004

Die Strukturen der meisten nativen Serpine entsprechen der des in Abbildung 2.1-1 dargestellten  $\alpha_1$ -Antitrypsins. Lediglich die nativen Proteinformen der Thrombin-Inhibitoren ATIII und HCII weisen diskrete Unterschiede der Konformation auf. Die Region um das proximale Scharnier zeigt bei diesen beiden Serpinen deutliche Unterschiede. Die Aminosäuren P14 und P15 des RCL sind als zusätzlicher Strang in die obere Struktur des  $\beta$ -Faltblatts A integriert (Abbildung 2.1-2)<sup>1</sup>. Die Bindung eines Heparin-Pentasaccharids induziert beim ATIII Konformationsänderungen, die einen Großteil des Proteins umfassen<sup>2</sup>. Neben der  $\alpha$ -Helix D beeinflussen die strukturellen Änderungen auch das  $\beta$ -Faltblatt A, wodurch der in dieses  $\beta$ -Faltblatt partiell inserierte RCL exponiert wird (siehe Abbildung 2.1-2). Durch die Bindung von Heparin entsteht eine Konformation des ATIII, die eine größere Übereinstimmung mit der Konformation von  $\alpha_1$ -Antitrypsin in Abbildung 2.1-1 aufweist<sup>3</sup>. Die Besonderheiten am proximalen Scharnier von ATIII und HCII sind hervorzuheben, da bekannt ist, dass diese Region für die Reaktivität von Serpinen von entscheidender Bedeutung ist<sup>4</sup> (siehe nachfolgenden Abschnitt).

### 2.1.2 Hemmung von Serinproteasen durch inhibitorische Serpine

Die Funktion von Serinproteasen ist die katalytische Spaltung von Peptidbindungen. Diese Funktion wird durch das reaktive Zentrum der Protease realisiert, das aus den als „katalytische Triade“ bezeichneten Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat besteht<sup>5</sup>. Serpine reagieren mit Serinproteasen als sogenannte „Selbstmord-Inhibitoren“, d.h. sie unterbrechen den proteolytischen Vorgang des Mechanismus der „katalytische Triade“. Bei einer katalytischen Spaltung geht die Protease normalerweise durch eine Deacylierungsreaktion wieder aus dem Spaltkomplex hervor. Diese Deacylierung ist bei der Reaktion mit Serpinen um mehrere Größenordnungen verlangsamt, so dass die Protease mit dem Inhibitor kovalent verknüpft bleibt. Dies wird durch Konformationsänderungen am Serpin und bei der Protease im Verlauf der Inhibitionsreaktion verursacht.

Im Gegensatz zu anderen Proteinen ist die native Konformation der Serpine nicht die stabilste Proteinform, sondern das native Serpin befindet in einem gespannten (*stressed*), metastabilen Zustand. Während der Inhibitionsreaktion wird das Serpin zwischen den P1-P1'-Aminosäuren der reaktiven Schleife gespalten. Dieser Vorgang führt zu Konformationsänderungen, die eine Proteinform begünstigen, welche eine höhere thermodynamische Stabilität besitzt (*relaxed form*)<sup>6</sup>. Die Konformationsänderungen induzieren auch eine Deformation der Protease und sind essentiell für die Hemmung von Serinproteasen durch inhibitorische Serpine.

---

<sup>1</sup> Carrell *et al.*, 1994; Schreuder *et al.*, 1994; Skinner *et al.*, 1997; Baglin *et al.*, 2002

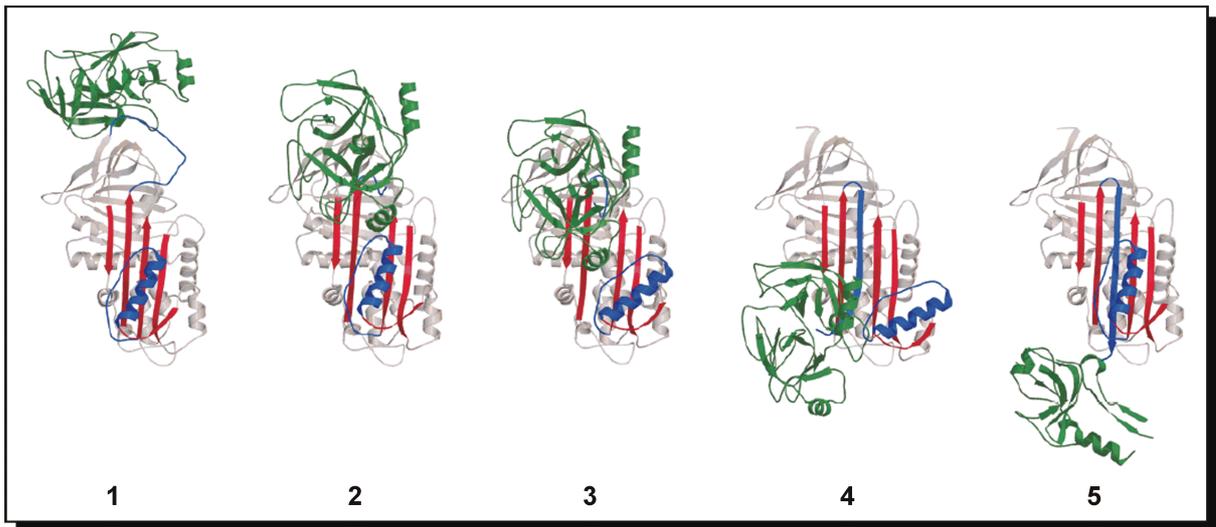
<sup>2</sup> Pike *et al.*, 1997; Huntington *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Whisstock *et al.*, 2000

<sup>3</sup> Jin *et al.*, 1997

<sup>4</sup> Hopkins *et al.*, 1993 ; Hopkins & Stone, 1995

<sup>5</sup> Genest & Ptak, 1982; Tobin *et al.*, 1995; Plotnick *et al.*, 1996; Krüger, 2003

<sup>6</sup> Bruch *et al.*, 1988; Gettins & Harten, 1988



**Abbildung 2.1-3:** Schematische Darstellung der Komplexbildung von Serpin und Protease (aus Gettins, 2002<sup>b</sup>). Die farbig markierten Strukturelemente am Serpin sind das  $\beta$ -Faltblatt A (rot) sowie die  $\alpha$ -Helix F und die reaktive Schleife (jeweils blau). Die Serinprotease ist in grün abgebildet. Der nicht kovalente Begegnungskomplex (Michaelis-Komplex) vor der Spaltung der reaktiven Schleife (1) geht zum Zeitpunkt der proteolytischen Spaltung in das kovalent verknüpfte Serpin-Acyl-Protease-Intermediat über (2). Die reaktive Schleife inseriert als zusätzlicher Strang in das  $\beta$ -Faltblatt A, wobei die gebundene Protease zu dem anderen Pol des Serpins geführt wird (3–4). Bei diesem Vorgang bewegt sich die  $\alpha$ -Helix F und „schließt“ nach vollständiger Insertion der reaktiven Schleife die  $\beta$ -Faltblattstruktur A (5). Im finalen Komplex ist die Protease durch die Konformationsänderung deformiert und ihr reaktives Zentrum ist dadurch inaktiviert.

Der initiiierende Schritt der Inhibitionsreaktion ist die Spaltung des Serpins an der Position P1 der reaktiven Schleife durch die Protease. Der N-terminale Bereich der reaktiven Schleife (P1 bis P14) kann als zusätzlicher Strang in die Struktur des  $\beta$ -Faltblatts A inserieren (siehe Abbildung 2.1-3). Die Erweiterung des  $\beta$ -Faltblatts A von einer Fünf- zu einer Sechs-Strang-Struktur ist thermodynamisch begünstigt<sup>1</sup>. Weitere Teile des Serpins sind von den Konformationsänderungen betroffen und haben Einfluss auf die Inhibitionsreaktion. Das proximale Scharnier (P9-P15, Abbildung 2.1-1) beeinflusst die Insertion der reaktiven Schleife in das  $\beta$ -Faltblatt A<sup>2</sup>. Mutationen am proximalen Scharnier führen zu dramatischen Veränderungen des Inhibitionsmechanismus und verhindern das „Einklappen“ der reaktiven Schleife in die Faltblattstruktur<sup>3</sup>. Auch wird vermutet, dass die  $\alpha$ -Helix F eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Protease spielt<sup>4</sup>. Die  $\alpha$ -Helix F scheint als eine Art Verschluss zu fungieren und die Irreversibilität der Hemmung zu bewirken.

Die strukturellen Änderungen sind nicht auf das Serpin beschränkt, sondern betreffen auch die Protease. Das Enzym ist über eine Acylbindung des Serins 195 mit der Aminosäure P1 des Serpins kovalent mit dem Inhibitor verknüpft. Die Insertion der reaktiven Schleife des Serpins in das  $\beta$ -Faltblatt A führt zu einer Translokation der gebundenen Protease um ca. 70 Å auf

<sup>1</sup> Carrell & Owen, 1985; Bruch *et al.*, 1988

<sup>2</sup> Hopkins *et al.*, 1993; Hopkins & Stone, 1995

<sup>3</sup> Stein & Carrell, 1995

<sup>4</sup> Gooptu *et al.*, 2000; Gettins, 2002<sup>b</sup>; Cabrita *et al.*, 2004

den gegenüberliegenden Pol des Serpins<sup>1</sup>. Im Verlauf der Translokation kommt es wahrscheinlich auch zu einer Torsion der gebundenen Protease, was eine Änderung des katalytischen Zentrums zur Folge hat (Abbildung 2.1-3). Die Anordnung der „katalytische Triade“ ändert sich um mehr als 3 Å und die Protease verliert ca. 40 % ihrer ursprünglichen Struktur<sup>2</sup>. Durch diesen Vorgang ist die proteolytische Aktivität der Protease zerstört, und der kovalente Acyl-Komplex von Serpin und Protease kinetisch stabil gegenüber einer möglichen Deacylierung<sup>3</sup>. Die kinetische Stabilität ist abhängig von der Länge der reaktiven Schleife. Eine Verlängerung reduziert die Stabilität des Komplexes, hingegen reagiert ein Serpin mit verkürzter Schleife vollständig als Substrat und hat keine inhibitorischen Eigenschaften. Wahrscheinlich ist in beiden Fällen die Deformation der Protease nicht ausreichend um deren Reaktivität dauerhaft zu unterbinden<sup>4</sup>.

Die Strukturänderungen am Serpin wie auch der Protease unterstützen auch die Internalisierung des Komplexes. Durch die geänderten Konformationen löst sich der Komplex schneller von Kofaktoren und kann von Rezeptoren besser identifiziert werden<sup>5</sup>.

### 2.1.3 Der Verlauf der Reaktion von Serinproteasen mit inhibitorischen Serpinen

Die molekulare Grundlage der Hemmung von Serinproteasen durch Serpine ist die strukturelle Deformation der Protease im kovalenten Komplex. Das *branched pathway*-Modell beschreibt den charakteristischen Reaktionsverlauf<sup>6</sup> (Abbildung 2.1-4). Das Modell kann durch zwei wesentliche Teilschritte beschrieben werden. Erstens, durch die Bildung des kovalenten Komplexes im inhibitorischen Pfad und zweitens durch die Serpin-Hydrolyse im Substratpfad. Beide Pfade konkurrieren miteinander und ihr Verhältnis zueinander definiert die Effektivität des Serpins als Inhibitor.

Beide Teilschritte verlaufen anfangs über einen gemeinsamen Zweistufenmechanismus, bei dem die zweite Stufe irreversibel ist. In der ersten Stufe reagieren Serpin und Protease in einer Gleichgewichtsreaktion zu einem nicht-kovalenten Komplex (Michaelis-Komplex). Dieser Komplex kann dann im weiteren Verlauf des Mechanismus durch proteolytische Spaltung des Serpins in das Serpin-Acyl-Protease-Intermediat (Acyl-Intermediat) überführt werden. Dabei kommt es zur Ausbildung einer Esterbindung zwischen der P1-Position des Serpins und Serin<sup>195</sup> der „katalytischen Triade“ der Protease (Abbildung 2.1-4). Das Acyl-Intermediat kann durch Insertion der reaktiven Schleife in das  $\beta$ -Faltblatt A ( $k_{inh}$ ) in den kovalenten Komplex überführt werden. Dieser stellt das Endprodukt dar, da die Deacylierung ( $k_{diss}$ ) nur sehr langsam stattfindet. Unter physiologisch relevanten Bedingungen ist der kovalente

---

<sup>1</sup> Stratikos & Gettins, 1999; Huntington *et al.*, 2000<sup>b</sup>

<sup>2</sup> Huntington *et al.*, 2000<sup>b</sup>

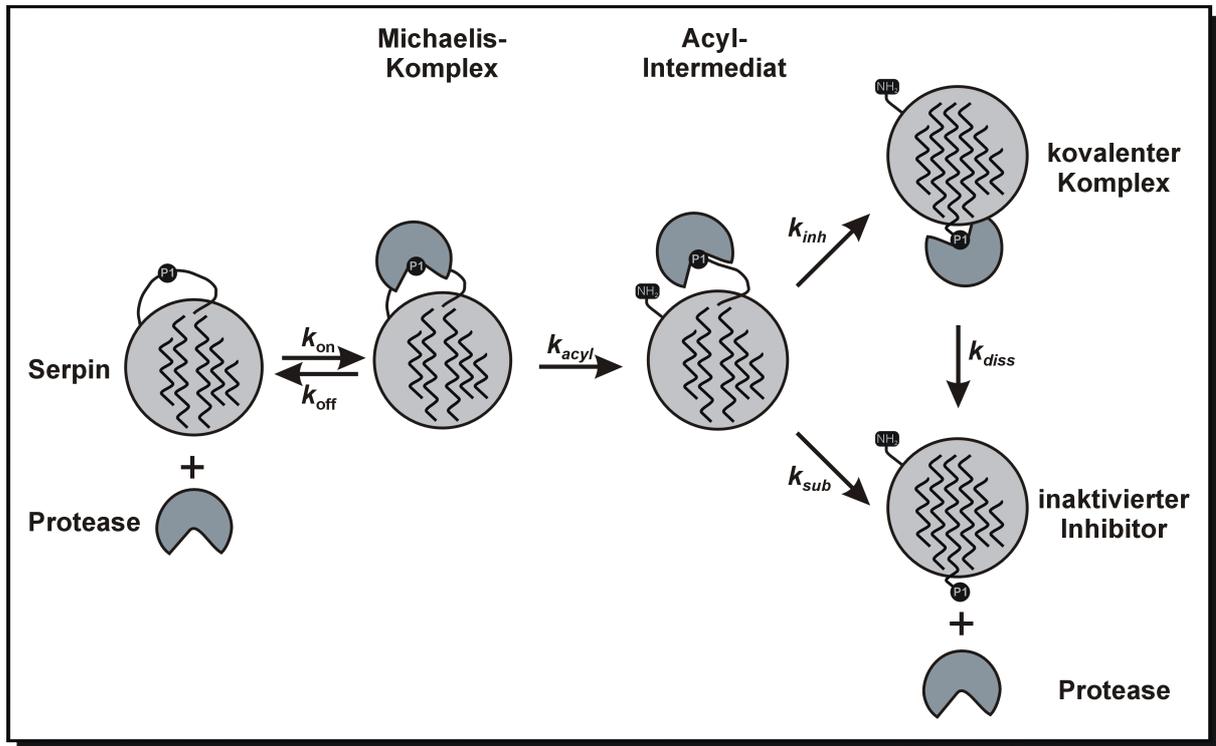
<sup>3</sup> Peterson & Gettins, 2001

<sup>4</sup> Kaslik *et al.*, 1997; Futamura *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001

<sup>5</sup> Hoffman *et al.*, 1989; Huntington, 2003

<sup>6</sup> Lawrence *et al.*, 1995; Lawrence *et al.*, 2000

Komplex bis zu mehreren Wochen stabil<sup>1</sup>. *In vivo* kommt es zum Abbau des Komplexes innerhalb weniger Minuten.



**Abbildung 2.1-4:** Schematische Darstellung des *branched pathway*-Reaktionsmechanismus inhibitorischer Serpine (verändert nach Schechter & Plotnick, 2003; Gettins, 2002<sup>a</sup>).

Der initiiierende Schritt ist die Bildung des nicht-kovalenten Michaelis-Komplexes (mit den Bildungs- und Dissoziationsraten  $k_{on}$  und  $k_{off}$ ). Die Spaltung des Serpins ( $k_{acyl}$ ) führt zur Bildung des Acyl-Intermediates, welches zwei unterschiedliche Reaktionspfade beschreiben kann.

Der Substratpfad findet in Konkurrenz zum inhibitorischen Pfad statt. Der katalytische Mechanismus der Protease ist dabei ungehindert und es kommt durch Deacylierung des Acyl-Intermediats lediglich zur Spaltung des Serpins ( $k_{sub}$ ). Das Verhältnis der beiden Reaktionspfade wird durch das Verhältnis der Geschwindigkeit der Insertion der reaktiven Schleife in die  $\beta$ -Faltblattstruktur zur Geschwindigkeit der Deacylierungsreaktion bestimmt<sup>2</sup>. Die Größen der beiden Geschwindigkeiten werden durch strukturelle Aspekte des Serpins bestimmt, d.h. wie gut eine Insertion der reaktiven Schleife in das  $\beta$ -Faltblatt A erfolgen kann. Ist  $k_{inh}$  sehr viel größer als  $k_{sub}$ , reagiert das Serpin nahezu ausschließlich als Inhibitor. Ist hingegen  $k_{inh}$  kleiner als  $k_{sub}$ , fungiert das Serpin als Substrat und wird zu großen Teilen proteolytisch gespalten, wobei die Protease wieder als reaktive Komponente an weiteren Reaktionen mit dem Serpin teilnehmen kann. Das Verhältnis beider Reaktionspfade wird als Stöchiometrie der Inhibition (SI) bezeichnet, mit der Definition  $SI = (k_{sub} + k_{inh}) / k_{inh}$ . Der SI-Wert ist nicht mit der Reaktions-Stöchiometrie zu verwechseln. Serpin/Protease-Reaktionen können einen SI-Wert größer als eins besitzen, obwohl jeweils nur ein Molekül

<sup>1</sup> Zhou *et al.*, 2001; Calugaru *et al.*, 2001; Plotnick *et al.*, 2002<sup>a</sup>

<sup>2</sup> Lawrence *et al.*, 2000; Gettins, 2002<sup>a</sup>

der Protease mit einem Molekül Serpin reagiert<sup>1</sup>. Reaktionen von physiologischer Relevanz haben einen SI-Wert von nahezu eins, doch gibt es auch viele Beispiele für biologische Reaktionen von Serpinen mit einem SI-Wert größer eins<sup>2</sup>. Vor allem Reaktionen mit gentechnisch erzeugten Varianten von Serpinen zeigen höhere SI-Werte von bis zu zehn<sup>3</sup>. Von Bedeutung ist dabei die Geschwindigkeit der Insertion der reaktiven Schleife in das  $\beta$ -Faltblatt A. Eine Störung dieser Einlagerung führt zu erhöhten SI-Werten<sup>4</sup>.

## 2.2 Heparinkofaktor II

### 2.2.1 Eigenschaften und Struktur von Heparinkofaktor II

Das Serpin Heparinkofaktor II (HCII) wurde durch seine Funktion identifiziert, die Serinprotease Thrombin, den zentralen Regulationspunkt der Hämostase, zu inhibieren<sup>5</sup>. HCII erfüllt somit eine ähnliche biologische Funktion wie Antithrombin III (ATIII), und beide Inhibitoren sind Mitglieder unterschiedlicher Serpin-Subfamilien<sup>6</sup>. In der Literatur wird HCII auch als Heparinkofaktor A, Leuserpin-2, Antithrombin BM oder Dermatansulfat-Kofaktor bezeichnet<sup>5, 7</sup>. Der systematische Name für HCII ist SERPIN D1 nach der Nomenklatur von Silverman *et al.*, 2001, und es wird in die  $\alpha_1$ -Antitrypsin-Subfamilie eingeordnet. In der sechsfach unterteilten Serpinfamilie gehört HCII zur Gruppe 2 nach der Klassifizierung von Ragg *et al.*, 2001. Das HCII-Gen umfasst fünf Exons und vier Introns<sup>8</sup> mit einer Gesamtgröße von 15,8 kB und befindet sich auf dem Chromosomenbereich 22q11<sup>9</sup>. HCII findet sich im humanen Blutplasma in Konzentrationen von 80  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 1,2  $\mu\text{M}$ <sup>10</sup>. Es wird von der Leber in den Blutstrom sezerniert und hat dort eine biologische Halbwertszeit von ca. 2½ Tagen<sup>11</sup>. Seine durch Sedimentations-Gleichgewichtsmessungen bestimmte Molekularmasse beträgt 65,6 kDa<sup>12</sup>. Massenbestimmungen durch die relative Wanderungsgeschwindigkeit in SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (PAGE) liefern je nach Elektrophoresebedingungen ein deutlich abweichendes Ergebnis, mit Werten von 66 bis 78 kDa<sup>13</sup>.

---

<sup>1</sup> Patston *et al.*, 1991; Schechter *et al.*, 1993; Djie *et al.*, 1996

<sup>2</sup> Olson, 1985; Schechter *et al.*, 1989

<sup>3</sup> Schechter *et al.*, 1993; Djie *et al.*, 1996; Bottomly & Stone, 1998

<sup>4</sup> Lawrence *et al.*, 2000

<sup>5</sup> Briginshaw & Shanberge, 1974

<sup>6</sup> Griffith *et al.*, 1985<sup>a</sup>; Inhorn & Tollefsen, 1986

<sup>7</sup> Wunderwald *et al.*, 1982; Abildgaard & Larsen, 1984; Ragg, 1986

<sup>8</sup> Ragg & Preibisch, 1988; Kamp & Ragg, 1999

<sup>9</sup> Herzog *et al.*, 1991

<sup>10</sup> Tollefsen & Pestka, 1985<sup>a</sup>

<sup>11</sup> Tollefsen & Pestka, 1985<sup>b</sup>; Sié *et al.*, 1985

<sup>12</sup> Tollefsen *et al.*, 1982

<sup>13</sup> Tollefsen *et al.*, 1982; Tollefsen *et al.*, 1983; Griffith *et al.*, 1985<sup>b</sup>

Humanes natives HCII ist ein einzelsträngiges Protein mit einer Länge von 480 Aminosäuren nach Abspaltung eines 19 Aminosäure langen Signalpeptids<sup>1</sup>. Die Aminosäuresequenz des HCII ist zu etwa 30 % mit der von ATIII,  $\alpha_1$ -Antitrypsin oder anderer verwandter Serpine identisch. Die größten Übereinstimmungen in der Aminosäureabfolge sind im carboxy-terminalen Bereich der Proteine zu finden. HCII besitzt eine N-terminale Erweiterung von ca. 80 Aminosäuren, die keine Homologie zu anderen Mitgliedern der Serpinfamilie aufweist. Dieser N-terminale Bereich von HCII ist für den Mechanismus der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin von entscheidender Bedeutung. Die Röntgenstruktur von nativem HCII ist nicht vollständig und der N-terminale Bereich (AS 1 - 94) konnte nicht dargestellt werden<sup>2</sup>. Die restliche HCII-Struktur (AS 95 – 480) gleicht dem in Abbildung 2.1-2 dargestellten nativen ATIII.

HCII besitzt drei Cysteingruppen, die in allen bislang untersuchten Spezies konserviert sind<sup>3</sup>. Die Cysteine sind an keiner Disulfidbrücke beteiligt und chemische Modifikation der Cysteine durch Acetylierung hat keinen Einfluss auf die inhibitorische Aktivität gegenüber  $\alpha$ -Thrombin<sup>4</sup>. Wie viele Plasmaproteine gehört auch HCII zu der Gruppe der Glykoproteine. Es besitzt einen Kohlenhydratanteil, der ca. 10 % der Masse des Proteins ausmacht. HCII besitzt drei potentielle N-Glykosylierungsstellen. Die N-Glykane bestehen aus dem komplex diantennären und dem komplex triantennären Typ im Verhältnis 6:1 und tragen zu 90 % eine terminale  $\alpha$ 2-6 verknüpfte N-Acetylneuraminsäure<sup>5</sup>.

HCII inaktiviert Thrombin durch Bildung eines stabilen 1:1 Komplexes. Es reagiert als Pseudosubstrat über eine C-terminale reaktiven Spaltstelle<sup>6</sup>. In Serpinen wird die Protease-Spezifität meist durch die Spezifität der Spaltstelle P1-P1' innerhalb der reaktiven Schleife determiniert. Beim HCII wird diese Spaltstelle von den Aminosäuren Leu<sup>444</sup> und Ser<sup>445</sup> gebildet. Sie ist damit identisch mit Spaltstellen typischer Chymotrypsin-Inhibitoren wie  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin oder Cathepsin G<sup>7</sup>. Eine inhibitorische Wirkung von HCII auf die Aktivität dieser Proteasen ist bekannt<sup>8</sup>. Das physiologische Target ist aber Thrombin, welches im Plasma und Gewebe lokalisiert ist. Thrombin spaltet spezifisch nach einem Arginin in der P1-Position eines Serpins, wie sie bei den Thrombin-Inhibitoren ATIII oder Protein C-Inhibitor vorkommt<sup>9</sup>. Diese Spezifität erklärt, warum die Hemmung von Thrombin durch nicht aktiviertes HCII gering ist<sup>10</sup>. Die Anwesenheit eines Leucins in der P1-Position

---

<sup>1</sup> Ragg, 1986; Blinder *et al.*, 1988

<sup>2</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>3</sup> Ragg, 1986; Westrup & Ragg, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Sheffield *et al.*, 1994; Colwell & Tollefsen, 1998

<sup>4</sup> Church *et al.*, 1987

<sup>5</sup> Böhme *et al.*, 2002

<sup>6</sup> Tollefsen *et al.*, 1982; Parker & Tollefsen, 1985; Griffith *et al.*, 1995<sup>a</sup>

<sup>7</sup> Morii & Travis, 1983

<sup>8</sup> Church *et al.*, 1985; Parker & Tollefsen, 1985; Pratt *et al.*, 1990

<sup>9</sup> Huber & Carrell, 1989

<sup>10</sup> Derechin *et al.*, 1990

macht HCII zu einem weniger geeigneten Inhibitor für Thrombin<sup>1</sup>. Doch kann durch Wechselwirkung mit Kofaktoren wie Heparin oder Dermatansulfat die Reaktionsgeschwindigkeit von HCII gegenüber  $\alpha$ -Thrombin mehr als 1000-fach gesteigert werden. Die Grundlage für diese Reaktivitätssteigerung sind Konformationsänderungen, die unter anderem auch die reaktive Schleife des Serpins betreffen und diese besser für den proteolytischen Angriff positionieren (siehe 2.2.3). Dadurch wird die weniger gute Eignung des Leucins in der Spaltstelle von HCII kompensiert.

### 2.2.2 Glykosaminoglykan-Bindung von HCII

HCII gehört zu den Glykosaminoglykan-bindenden Serpinen und besitzt eine Affinität zu vielen natürlichen und synthetischen Polyanionen, in deren Gegenwart die Rate der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin mehr als 1000-fach erhöht wird<sup>2</sup>. Wie die anderen  $\alpha$ -Thrombin-Inhibitoren ATIII, Protein C-Inhibitor und Nexin-1 bindet auch HCII an Heparin oder Heparansulfat. Jedoch wird nur HCII auch durch Dermatansulfat und Dermatansulfat-Proteoglykane wie Decorin oder Biglycan in seiner Aktivität gegenüber  $\alpha$ -Thrombin beeinflusst<sup>3</sup>.

Für die Bindung der polyanionischen Glykosaminoglykane sind basische Aminosäuren verantwortlich (Abbildung 2.2-1). Bei HCII wie auch bei ATIII liegen diese Aminosäuren hauptsächlich innerhalb der  $\alpha$ -Helix D und teilweise in der  $\alpha$ -Helix A<sup>4</sup>. Die Assoziation von Glykosaminoglykanen führt wahrscheinlich zu Konformationsänderungen am HCII. Für ein synthetisches Peptid, das den Aminosäuren 165 bis 195 der  $\alpha$ -Helix D von HCII entspricht, konnte gezeigt werden, dass sich die  $\alpha$ -helicale Struktur dieses Peptids in Gegenwart der Glykosaminoglykane Heparin oder Dermatansulfat drastisch erhöht<sup>5</sup>. ATIII bindet Heparin durch eine charakteristische Pentasaccharid-Sequenz, über einen *induced fit*-Mechanismus. Dieser Mechanismus induziert schnelle Konformationsänderungen (siehe Abbildung 2.1-2), die die Affinität von ATIII zum gesamten Heparin um den Faktor 1000 erhöhen. Auch beim HCII wird ein solcher Mechanismus vermutet<sup>6</sup>.

---

<sup>1</sup> Griffith *et al.*, 1985<sup>a</sup>; Ciaccia *et al.*, 1997; Filion *et al.*, 2004

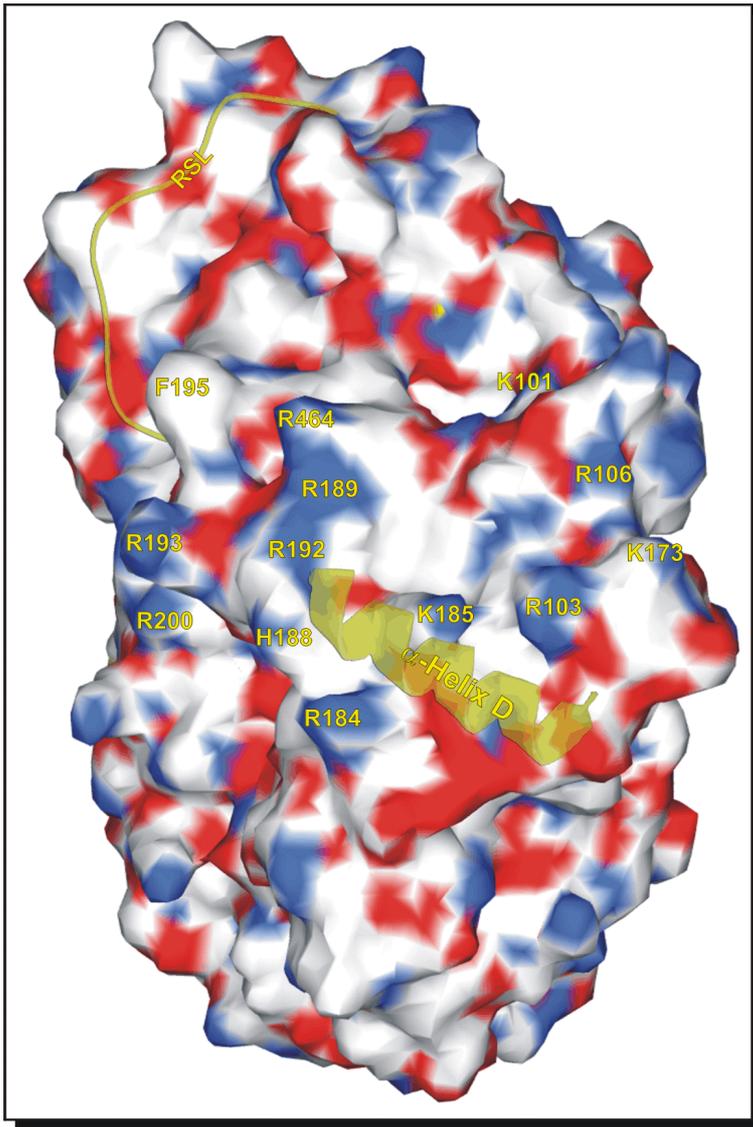
<sup>2</sup> Klauser, 1991; Hayakawa *et al.*, 1995; Hayakawa *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1997; Pavao *et al.*, 1998; Colwell *et al.*, 1999; Weitz *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>b</sup>

<sup>3</sup> Pratt *et al.*, 1989; Pratt *et al.*, 1992; Pratt & Church, 1993

<sup>4</sup> Rogers *et al.*, 1992; Tollefsen, 1995; Holland *et al.*, 2000; Hayakawa *et al.*, 2002

<sup>5</sup> Whinna & Church, 1994

<sup>6</sup> Huntington, 2003; O'Keeffe *et al.*, 2004



**Abbildung 2.2-1:** Abbildung der Oberflächenstruktur und -ladung von HCII (AS 95-480, PDB ID 1JMJ, A)<sup>1</sup>. Positive Ladungspotentiale sind blau, negative Ladungspotentiale rot dargestellt. Gekennzeichnet sind Aminosäuren mit vermuteter Bedeutung für die Glykosaminoglykan-Bindung innerhalb der  $\alpha$ -Helix A und  $\alpha$ -Helix D. Weitere gekennzeichnete Positionen sind F195, R200 und R464, die in dieser Arbeit diskutiert werden. Zur Orientierung sind die Strukturen der Glykosaminoglykan-Bindestelle ( $\alpha$ -Helix D) und der reaktiven Schleife (RCL) als Teilelemente einer Bänderstruktur hinzugefügt (gelb).

Anhand von Mutationsexperimenten konnte belegt werden, dass beim HCII Lysin- und Argininreste die Bindung der Polyanionen verursachen. Die Glykosaminoglykan-Bindestellen für Heparin und Dermatansulfat sind nicht identisch, überlappen sich jedoch teilweise<sup>2</sup>.

Die Aminosäure K101 der  $\alpha$ -Helix A, K173 im Bereich zwischen den  $\alpha$ -Helices C und D, sowie R184 und K185 der  $\alpha$ -Helix D konnten als basische Aminosäuren identifiziert werden, die die Heparinbindung von HCII unterstützen<sup>3</sup>. An der Dermatansulfat-Bindung von HCII sind die Aminosäuren R106 ( $\alpha$ -Helix A), R184, K185, R189 und H188 der  $\alpha$ -Helix D, sowie R192 und R193 zwischen  $\alpha$ -Helix D und Strang 2 des  $\beta$ -Faltblatts A beteiligt<sup>4</sup>. Es wird vermutet, dass diese Aminosäuren nicht allein ausreichend für die Dermatansulfat-Bindung von HCII sind, da auch im ATIII äquivalente Positionen mit positiven Aminosäuren besetzt

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Blinder *et al.*, 1989; Church *et al.*, 1989<sup>b</sup>; Blinder & Tollefsen, 1990; Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Whinna *et al.*, 1991

<sup>3</sup> Blinder & Tollefsen, 1990; Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Whinna *et al.*, 1991; Hayakawa *et al.*, 2002

<sup>4</sup> Blinder *et al.*, 1989; Blinder & Tollefsen, 1990; Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Liaw *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2002

sind, ATIII im Gegensatz zu HCII aber kein Dermatansulfat bindet<sup>1</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wird diskutiert, dass das in räumlicher Nähe zur  $\alpha$ -Helix D befindliche R464 möglicherweise an der Dermatansulfat-Bindung beteiligt ist (Abbildung 2.2-1). Die äquivalente Position ist beim ATIII nicht mit einer basischen Aminosäure besetzt.

Für die anionenbindende  $\alpha$ -Helix D wurde eine weitere Funktion postuliert. Die etwa 80 Aminosäuren umfassende N-terminale Domäne ist im nativen HCII intramolekular am globulären Proteinkern assoziiert. Die Assoziation wird durch ionische Wechselwirkungen verursacht, die sich zwischen negativ geladenen Aminosäuren des N-Terminus und den basischen Aminosäuren der  $\alpha$ -Helix D ausbilden<sup>2</sup>. Diese Interaktion wird durch hohe Ionenstärken oder durch Zugabe von Glykosaminoglykanen gestört. Mutationsexperimente deuten darauf hin, dass die intramolekulare Assoziation des N-Terminus durch die Aminosäuren R184, R192 und R193 bewirkt wird<sup>3</sup>. Auch die Position R200 scheint für die Bindung des N-Terminus an den Proteinkern von Bedeutung zu sein<sup>4</sup>. In der Röntgenstruktur von nativem HCII konnten weder die Positionierung noch die Struktur der N-terminalen Domäne bestimmt werden<sup>5</sup>.

### 2.2.3 Mechanismus der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin durch HCII

$\alpha$ -Thrombin wird *in vivo* maßgeblich durch die beiden Serpine ATIII und HCII reguliert<sup>6</sup>. Auch wenn die biochemische Funktion der beiden Inhibitoren identisch ist, weist ihr Mechanismus der Hemmung diskrete Unterschiede auf. Die unkatalysierte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin ist beim HCII um den Faktor 10 langsamer als beim ATIII. Dies hat offensichtlich seine Ursache in den unterschiedlichen Aminosäuren der P1-Positionen in den reaktiven Schleifen der beiden Serpine<sup>7</sup> (2.2.1). In der Gegenwart von aktivierenden Glykosaminoglykanen wie Heparin erreicht HCII aber eine um mehr als 1000-fach höhere Rate der Inhibition, die damit in der gleichen Größenordnung wie die Inhibitionsrate des ATIII unter identischen Bedingungen liegt. Bei diesem Inhibitionsmechanismus spielt der N-Terminus von HCII eine entscheidende Rolle<sup>8</sup>.

Bei der Glykosaminoglykan-aktivierten Inhibition sind auch Strukturelemente außerhalb des katalytischen Zentrums von  $\alpha$ -Thrombin von Bedeutung.  $\alpha$ -Thrombin besitzt zwei auf der Proteinoberfläche exponierte Bereiche, die durch benachbarte basische Aminosäuren gebildet werden. Diese beiden anionenbindenden Bereiche werden als Exosite I und Exosite II

---

<sup>1</sup> Blinder & Tollefsen, 1990

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a,b</sup>; Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Sheehan *et al.*, 1994

<sup>3</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a,b</sup>; Liaw *et al.*, 1999

<sup>4</sup> Ciaccia *et al.*, 1997

<sup>5</sup> Baglin *et al.*, 2002

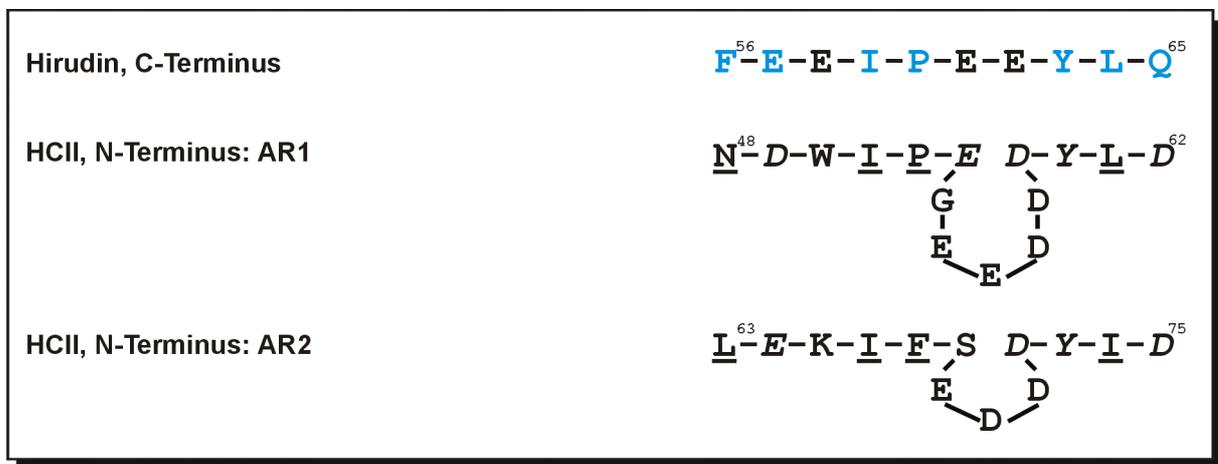
<sup>6</sup> Stubbs & Bode, 1993; Stein & Carrell, 1995

<sup>7</sup> Huntington, 2003

<sup>8</sup> Hortin *et al.*, 1989

bezeichnet<sup>1</sup>. Exosite I ist die Fibrinogen-Erkennungsstelle und Hirudin-Bindungsstelle und dient primär der Bindung von Inhibitoren<sup>2</sup>. Exosite II stellt die Heparin-Bindestelle von  $\alpha$ -Thrombin dar<sup>3</sup>.

Die ca. 80 Aminosäuren umfassende N-terminale Domäne von HCII enthält zwei nahezu identische Bereiche, die im hohen Maße negativ geladen sind. Die Ladungen werden durch neun Aspartat-, fünf Glutamat- und zwei quantitativ sulfatierte Tyrosinreste verursacht<sup>4</sup>. Diese negativen Bereiche besitzen Ähnlichkeiten mit dem C-Terminus des antithrombotisch wirkenden Proteins Hirudin<sup>5</sup>. Hirudin ist ein negativ geladenes, 65 Aminosäuren umfassendes Polypeptid des Blutegels *Hirudo medicinalis*<sup>6</sup>. Der C-terminale Bereich des Polypeptids ist in der Lage, an der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin zu binden und die Protease zu inhibieren<sup>7</sup>.



**Abbildung 2.2-2:** Vergleich des C-Terminus von Hirudin mit den negativ geladenen Bereichen AR1 und AR2 im N-Terminus von HCII (verändert nach Van Deerlin & Tollefsen, 1991). Aminosäuren von Hirudin, die den Kontakt zur Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin herstellen, sind blau dargestellt<sup>8</sup>. Zum Hirudin konservativ substituierte Aminosäuren im N-Terminus von HCII sind folgendermaßen gekennzeichnet: hydrophobe Gruppen sind unterstrichen und negativ geladene Gruppen sind kursiv dargestellt.

Für ein synthetisches Peptid, das die beiden negativen Bereiche des N-Terminus von HCII umfasst, konnte ebenfalls eine antithrombotische Aktivität belegt werden<sup>9</sup>. Im nativen HCII sind die beiden negativen Bereiche an der intramolekularen Assoziation des N-Terminus wie auch an der Wechselwirkung mit  $\alpha$ -Thrombin beteiligt. Dabei übernehmen die beiden

<sup>1</sup> Rogers *et al.*, 1992

<sup>2</sup> Stone *et al.*, 1987; Bode *et al.*, 1989; Bode & Huber, 1992

<sup>3</sup> Bode *et al.*, 1992 ; Stubbs & Bode, 1993

<sup>4</sup> Ragg, 1986; Hortin *et al.*, 1986; Blinder *et al.*, 1988; Böhme *et al.*, 2002

<sup>5</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>

<sup>6</sup> Markwardt, 1994

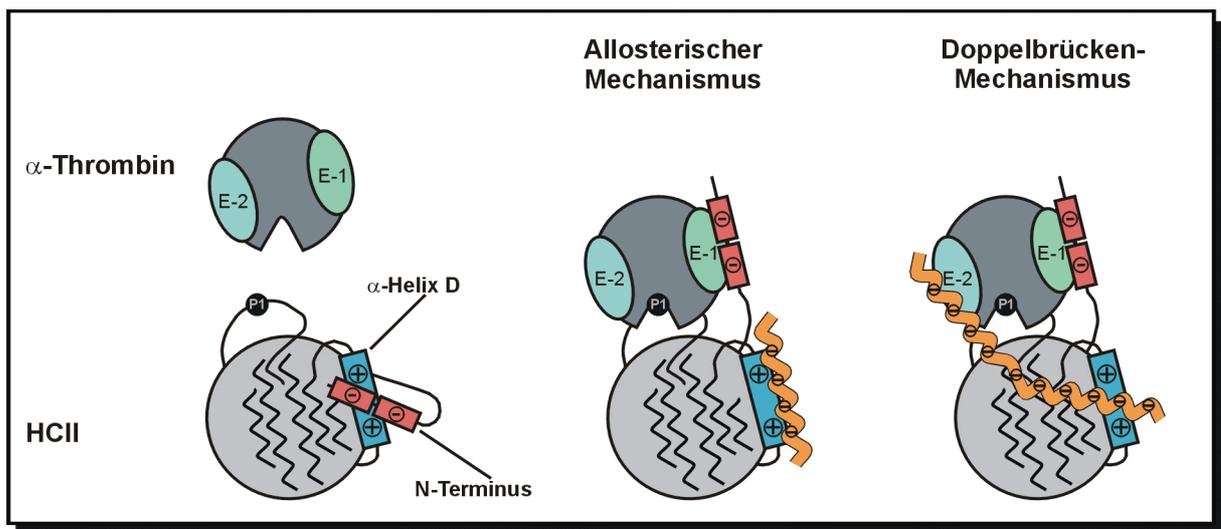
<sup>7</sup> Bode & Huber, 1992

<sup>8</sup> Grutter *et al.*, 1990; Rydel *et al.*, 1990

<sup>9</sup> Hortin *et al.*, 1989

Bereiche AR1 und AR2 möglicherweise unterschiedliche Funktionen<sup>1</sup>. Es wird angenommen, dass der Bereich AR1 die Assoziation zur Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin bewirkt, hingegen der Bereich AR2 die intramolekulare Bindung des N-Terminus an die  $\alpha$ -Helix D von HCII unterstützt.

Nach der gegenwärtigen Vorstellung ist die N-terminale Domäne im nativen HCII mit der Glykosaminoglykan-bindenden  $\alpha$ -Helix D (2.2.2) assoziiert. Diese intramolekulare Assoziation wird durch Glykosaminoglykane gestört, indem diese an die  $\alpha$ -Helix D binden und den N-Terminus des HCII verdrängen können<sup>2</sup>.



**Abbildung 2.2-3:** Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII (Abbildung nach Holland *et al.*, 2000, modifiziert und erweitert). Dargestellt sind  $\alpha$ -Thrombin mit der Hirudin-bindenden Exosite I (E-1) und der heparinbindenden Exosite II (E-2) sowie HCII mit der anionenbindenden  $\alpha$ -Helix D (blau), den beiden negativ geladenen Bereichen AR1 und AR2 des N-Terminus (rot) und die reaktiven Schleife mit der P1-Position. Die Bildung der beiden Michaelis-Komplexe (im allosterischen und im Doppelbrücken-Mechanismus) wird durch Glykosaminoglykane (orange) initiiert.

Durch den allosterischen Verdängungs-Mechanismus ist die N-terminale Domäne in der Lage, an die anionenbindende Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin zu binden (Abbildung 2.2-3). Dies begünstigt die Ausbildung eines Michaelis-Komplexes. Der Komplex verfügt über zwei Kontaktstellen zwischen dem Serpin und der Protease. Dies sind einerseits die Exosite-Wechselwirkung zwischen dem N-Terminus von HCII und der Exosite I und andererseits die Interaktion des katalytischen Zentrums von  $\alpha$ -Thrombin mit der reaktiven Schleife von HCII. Die zusätzliche Exosite-Wechselwirkung zwischen Serpin und Protease fördert den enzymatischen Angriff auf die Spaltstelle im RCL von HCII, und resultiert in einer gesteigerten Inaktivierung des  $\alpha$ -Thrombins in Gegenwart von Glykosaminoglykanen. Der weitere Verlauf der Hemmung entspricht dem zuvor beschriebenen Modell der Hemmung von Serinproteasen durch inhibitorische Serpine (siehe 2.1.2 und Abbildung 2.1-4).

<sup>1</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a,b</sup>; Van Deerlin & Tollefsen, 1999; Mitchell & Church, 2002

<sup>2</sup> Holland *et al.*, 2000; Mitchell & Church, 2002

Neben dem allosterischen Mechanismus wird auch ein Doppelbrücken-Mechanismus diskutiert, nach dem sowohl der N-Terminus von HCII wie auch das Glykosaminoglykan an  $\alpha$ -Thrombin binden (Abbildung 2.2-3)<sup>1</sup>. Der Doppelbrücken-Mechanismus wird auch als *template*-Mechanismus bezeichnet und spielt bei der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII nur eine untergeordnete Rolle. Ein Einfluss eines *template*-Mechanismus wurde nur bei der Heparin-aktivierten Reaktion detektiert. Bei der Dermatansulfat-aktivierten Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin leistet der *template*-Mechanismus keinen Beitrag<sup>2</sup>. Das mit HCII verwandte ATIII inhibiert  $\alpha$ -Thrombin ausschließlich über eine Brückenbildung. ATIII besitzt keine N-terminale Erweiterung, die mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin reagieren könnte. Die Hemmung wird durch einen ternären Komplex eingeleitet, bei dem Heparin oder Heparansulfat als *template* dienen. Die Glykosaminoglykane binden an die  $\alpha$ -Helix D von ATIII sowie an die Exosite II von  $\alpha$ -Thrombin und beschleunigen so die Inhibitionsreaktion<sup>3</sup>. Der für HCII postulierte allosterische Mechanismus basiert auf einer Interaktion zwischen der N-terminalen Domäne mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin. Zahlreiche Experimente konnten diese Interaktion und ihre Auswirkung auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin belegen. Mutationen in den negativ geladenen Bereichen AR1 und AR2 von HCII (Abbildung 2.2-2) beeinflussten die Geschwindigkeiten der Inhibitionsreaktion. Bei diesen Varianten bewirkte die Zugabe von Glykosaminoglykanen keine wesentliche Beschleunigung der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin<sup>4</sup>.

Auch die Deletion von Teilen des N-Terminus oder der gesamten N-terminalen Domäne von HCII führte dazu, dass Glykosaminoglykane keinen Einfluss mehr auf die Inhibitionsreaktion hatten<sup>5</sup>. Aufgrund des fehlenden N-Terminus kann keine Exosite-Interaktion mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin hergestellt werden und der allosterische Inhibitionsmechanismus ist verhindert.

Änderungen in der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin zeigten ebenso einen Einfluss auf die Hemmung durch HCII.  $\alpha$ -Thrombin-Varianten mit Mutationen in der anionenbindenden Exosite I zeigten keine wesentliche Beschleunigung der Inhibitionsreaktion durch HCII in Gegenwart von Glykosaminoglykanen<sup>6</sup>. Auch andere Kofaktoren wie spezifische  $\alpha$ -Thrombin-Aptamere oder das C-terminale Peptid von Hirudin, die an die Exosite I binden, waren in der Lage, eine effektive Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII zu verhindern<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Sheehan *et al.*, 1994; Liaw *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2000

<sup>2</sup> Sheehan *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1994; Liaw *et al.*, 1999

<sup>3</sup> Olson & Björk, 1991; Olson *et al.*, 1992; van Boeckel *et al.*, 1994

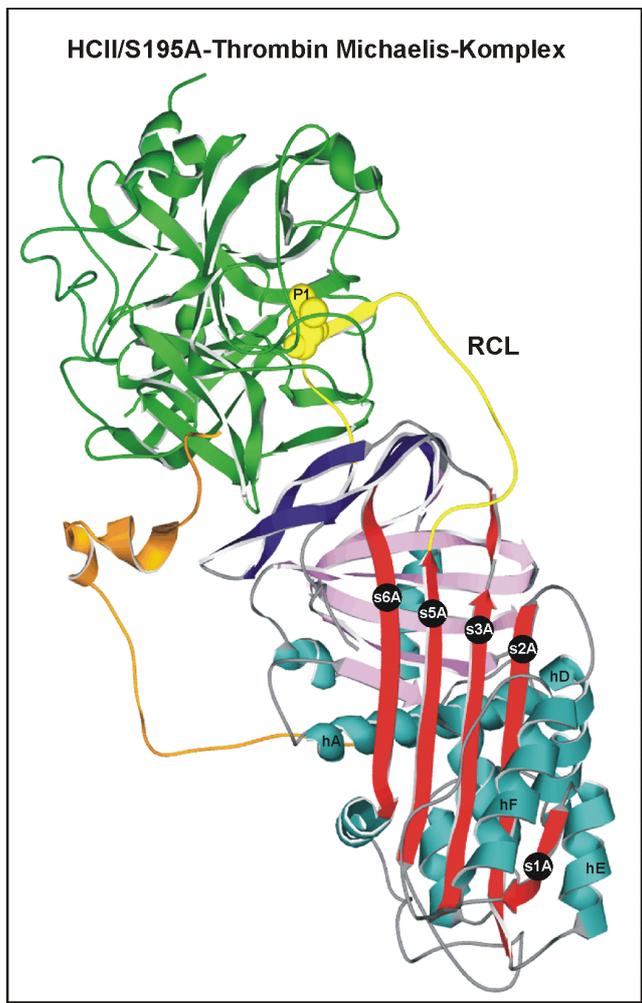
<sup>4</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Mitchell & Church, 2002

<sup>5</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Sheffield & Blajchman, 1995; Bauman & Church, 1999; Liaw *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>

<sup>6</sup> Sheehan *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1994; Myles *et al.*, 1998; Fortenberry *et al.*, 2004

<sup>7</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Liaw *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2000

Die aufgeführten Ergebnisse werden durch röntgenkristallographische Untersuchungen des Thrombin-Komplexes mit nativem HCII bestätigt. Baglin *et al.* konnten die Struktur des Michaelis-Komplexes aus HCII und S195A-Thrombin in wesentlichen Punkten klären<sup>1</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass der nicht-kovalente Michaelis-Komplex (Abbildung 2.2-4) zum Teil auf einer Exosite-Wechselwirkung basiert, wie es im allosterischen Mechanismus postuliert wurde (Abbildung 2.2-3). Im HCII/S195A-Thrombin Komplex befindet sich Thrombin oberhalb des  $\beta$ -Faltblatts C von HCII und hat Kontakt mit der N-terminalen Domäne wie auch der reaktiven Schleife des Inhibitors. Die reaktive Schleife von HCII ist im Michaelis-Komplex exponiert und nicht mehr partiell in das  $\beta$ -Faltblatt A inseriert (vergleiche Abbildung 5-3-1). S195A-Thrombin ist eine Variante von  $\alpha$ -Thrombin mit Alanin statt Serin in der Position 195 der „katalytischen Triade“. Die Inhibitionsreaktion kommt bei dieser Variante im Michaelis-Komplex zum Stillstand, da eine Acylierungsreaktion nicht erfolgen kann (vergleiche 2.1.3).

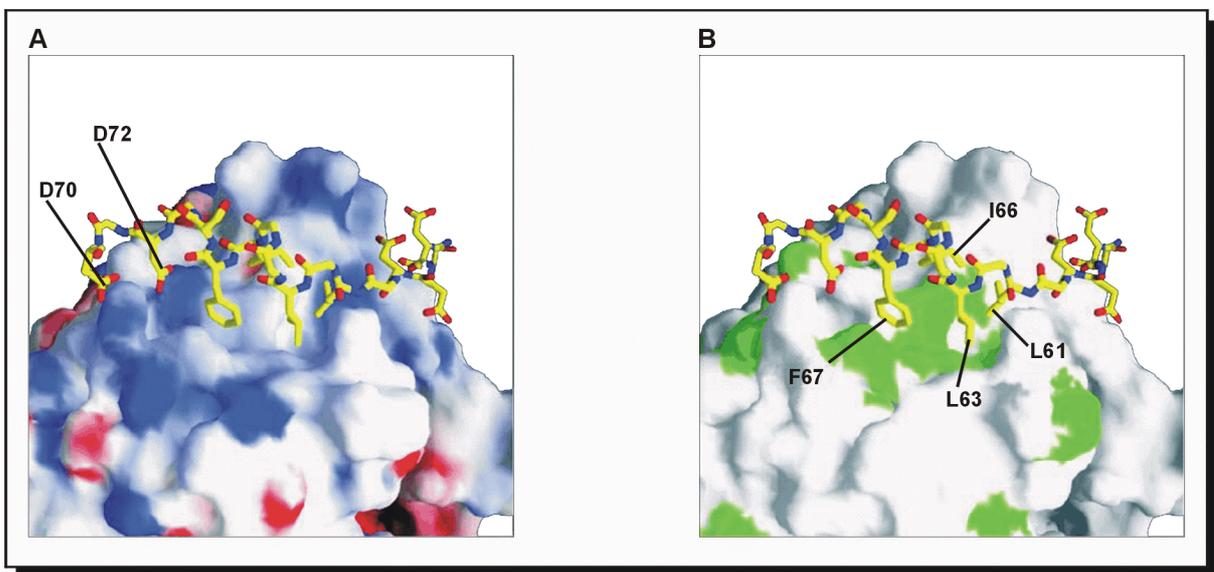


**Abbildung 2.2-4:** Struktur des nicht-kovalenten HCII/S195A-Thrombin Michaelis-Komplexes (PDB ID 1JMO<sup>95</sup>). Darstellung als Bändermodell mit S195A-Thrombin in grün. Die Elemente der Sekundärstrukturen von HCII entsprechen denen des in Abbildung 2.1-1 beschriebenen  $\alpha_1$ -Antitrypsins mit der Position P1 (Leucin) in Kalottendarstellung. Die reaktive Schleife von HCII (RCL) wird vom reaktiven Zentrum des Thrombins umspannt. Der N-Terminus von HCII hat Kontakt zur Oberfläche von Thrombin.

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

Der Michaelis-Komplex zwischen HCII und Thrombin, mit einer zusätzlichen Interaktionsstellen außerhalb der reaktiven Schleife, zeigt deutliche Unterschiede zu anderen charakterisierten Serpin/Protease-Komplexen. Das Ausmaß dieser Exosite-Interaktion ist für die hohe Rate der Glykosaminoglykan-aktivierten Hemmung von Thrombin durch HCII verantwortlich. Drei Regionen des HCII stehen in Kontakt zum Thrombin. Dies sind neben der reaktiven Schleife das  $\beta$ -Faltblatt C und die negativ geladenen Bereiche der N-terminalen Domäne<sup>1</sup>.

Der N-Terminus von HCII konnte im Michaelis-Komplex nicht vollständig identifiziert und lokalisiert werden. Lediglich die Aminosäurepositionen 54 bis 83 und 94 bis 480 von HCII waren aus den röntgenkristallographischen Daten zu bestimmen. Eine Interaktion mit Thrombin war zwischen den Aminosäuren 56 und 72 zu detektieren. Dieser Bereich entspricht weitgehend den beiden negativ geladenen Bereichen AR1 und AR2 im N-Terminus von HCII (Abbildung 2.2-2). Aufgrund von Mutationsexperimenten wurde bereits angenommen, dass die Aminosäuren der Positionen 55 bis 72 eine Bedeutung für die Interaktion mit  $\alpha$ -Thrombin besitzen<sup>2</sup>. Weiterhin wurde vermutet, dass die negativ geladenen Aminosäuren D72, Y(SO<sub>4</sub>)73 und D75 im Bereich AR2 von HCII für die intramolekulare Wechselwirkung des N-Terminus mit der  $\alpha$ -Helix D verantwortlich sind und weniger bei der Interaktion mit  $\alpha$ -Thrombin eine Rolle spielen<sup>3</sup>. Diese experimentellen Befunde wurden durch die Röntgenstruktur des HCII/S195A-Thrombin Michaelis-Komplexes bestätigt.



**Abbildung 2.2-5:** Wechselwirkung zwischen der Exosite I von Thrombin und der Hirudin-ähnlichen N-terminalen Domäne von HCII (verändert, nach Baglin *et al.*, 2002). Thrombin ist in Form der Oberflächenstruktur dargestellt, der N-Terminus von HCII ist als Stabmodell abgebildet (Seitengruppen, die keine Interaktion eingehen, sind nicht gezeigt). Bild A zeigt die Oberflächenladung von Thrombin (positive Ladungen sind blau, negative Ladungen rot dargestellt) und die ionischen Wechselwirkungen mit dem N-Terminus von HCII. Bild B stellt die Interaktionen des N-Terminus mit der hydrophoben Oberfläche (grün) des Thrombins dar.

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>b</sup>

<sup>3</sup> Mitchell & Church, 2002

Die kristallographische Analyse der Interaktion zwischen der Exosite I von Thrombin und dem N-Terminus von HCII ergab, dass ionische Wechselwirkungen sich nur zwischen den Aminosäuren D70 und D72 im Bereich AR2 des HCII finden lassen (Bild A, Abbildung 2.2-5). Andere Interaktionen zwischen geladenen Aminosäuren des HCII und der Exosite I von Thrombin wurden nicht nachgewiesen. Auch die sulfatierten Tyrosine (Y60, Y73) haben keinen Kontakt zur Oberfläche des Thrombins. Wie beim Hirudin/Thrombin-Komplex<sup>1</sup> sind die meisten Wechselwirkungen im HCII/S195A-Thrombin Michaelis-Komplex von hydrophobem Charakter. Die Exosite I von Thrombin besteht unter anderem aus mehreren hydrophoben Gruppen (F34, L65, Y76, I82, M84). Im Michaelis-Komplex mit HCII werden diese Gruppen durch hydrophobe Aminosäuren abgedeckt, die zwischen den beiden Hirudin-ähnlichen Bereichen AR1 und AR2 liegen. Dies sind die Aminosäuren L61, L63, I66 und F67 im N-Terminus von HCII (Bild B, Abbildung 2.2-5). Die entsprechende Region im Hirudin ist ebenfalls mit hydrophoben Gruppen an den entsprechenden Positionen besetzt<sup>2</sup>.

## 2.3 Glykosaminoglykane

Als Glykosaminoglykane werden die Kohlenhydratanteile von Proteoglykanen bezeichnet<sup>3</sup>. Proteoglykane bilden eine heterogene Gruppe von makromolekularen Glykokonjugaten bestehend aus kovalent an einen Proteinkern gebundenen sulfatierten Polysacchariden. Proteoglykane sind in tierischen Geweben weit verbreitet. Sie bilden einen der Hauptbestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) und werden von fast allen Zelltypen synthetisiert. Glykosaminoglykane bestehen aus bis zu 200 Monosacchariden mit unverzweigten, sich wiederholenden Disaccharideinheiten. Sie werden entsprechend dem basischen Charakter der Kohlenhydrate in drei Gruppen unterteilt<sup>4</sup>. Eine der Gruppen wird durch Heparin und Heparansulfat gebildet. Die Disaccharideinheiten werden beim Heparansulfat durch  $\beta$ 1,4-verknüpfte D-Glukuronsäure und 1,4-gebundenes  $\alpha$ -D-Glukosamin gebildet. Hingegen ist beim Heparin die D-Glukuronsäure zu 90 % gegen Iduronsäure ausgetauscht. Chondroitinsulfate bilden die zweite Gruppe. Chondroitinsulfat A und C bestehen aus einer  $\beta$ 1,4-verknüpften D-Glukuronsäure und 1,3-gebundenem  $\beta$ -N-Acetylgalaktosamin. Dermatansulfat (Chondroitinsulfat B) besitzt an Stelle von Glukuronsäure häufig eine Iduronsäure. Glykosaminoglykane sind nicht einheitlich, sondern weisen häufig Mikroheterogenitäten auf und tragen viele anionische Modifizierungen, wie z.B. Sulfat- oder Carboxylgruppen. Für Heparin ist bekannt, dass es die Fähigkeit zur Bindung von Zinkionen besitzt<sup>5</sup>. Dabei stellt das Heparinmolekül zwei unterschiedliche Interaktionsstellen mit einer hoch

---

<sup>1</sup> Stubbs *et al.*, 1992

<sup>2</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>3</sup> Bourin & Lindahl, 1993

<sup>4</sup> Iozzo, 1998

<sup>5</sup> Parrish & Fair, 1981; Woodhead *et al.*, 1986

affinen und einer niedrig affinen Bindungsstelle. Die Bindungskapazität ist in beiden Fällen hoch und im Durchschnitt wird ein Zinkion pro Disaccharideinheit gebunden.

Die biologische Aktivität von Proteoglykanen basiert auf der Interaktion ihrer negativ geladenen Glykosaminoglykane mit sehr unterschiedlichen Proteinen. Die Glykosaminoglykane mit einer enthaltenen Iduronsäure (Heparin oder Dermatansulfat) zeigen dabei eine stärkere Interaktion mit Proteinen, als solche Glykosaminoglykane die nur Glukuronsäure enthalten. Die physiologischen Funktionen von Proteoglykanen und Glykosaminoglykanen sind unterschiedlich. Sie können beispielsweise an der Signaltransduktion beteiligt sein, regulieren die Reifung von Geweben und das Zellwachstum, beeinflussen die Tumordinvasion, modulieren die Aktivitäten von Wachstumsfaktoren und sind an der Blutgerinnung beteiligt<sup>1</sup>. Die hemmende Wirkung von Glykosaminoglykanen und sulfatierten Polysacchariden auf die Blutgerinnung wird schon lange in der Medizin, in Form von Heparin als antithrombotisches Agens, verwendet. Die therapeutische Wirkung des Heparins wird durch die beiden Plasmaproteine ATIII und HCII vermittelt, die *in vivo* eher mit den Glykosaminoglykanen Heparansulfat bzw. Dermatansulfat interagieren<sup>2</sup>. Der aktivierende Effekt von Heparin auf die Hemmung von Thrombin durch ATIII basiert primär auf einer spezifischen Pentasaccharid-Sequenz innerhalb des Glykosaminoglykans, die nur zu ca. 4 % in Heparin oder Heparansulfat vorkommt<sup>3</sup>. Diese Pentasaccharid-Sequenz in Oligosacchariden bindet mit hoher Affinität an ATIII und liefert 90 % der Bindungsenergie. Die wirksamen hoch affinen Oligosaccharide bestehen aus wenigstens 18 Saccharideinheiten<sup>4</sup>.

Der Effekt von Heparin auf die Hemmung von Thrombin durch HCII wird durch die negative Gesamtladung des Glykosaminoglykans bewirkt<sup>5</sup>, ohne die Notwendigkeit der Präsenz einer spezifischen Saccharidsequenz<sup>6</sup>. Die aktivierende Eigenschaft des Heparin-Polyanions nimmt mit der Anzahl an Kohlenhydrateinheiten bis zu einer Länge von 20 Saccharidmonomeren zu<sup>7</sup>. Auch bei der Dermatansulfat-aktivierten Hemmung von Thrombin durch HCII ist das Ausmaß der negativen Ladung und Sulfatierung des Glykosaminoglykans ausschlaggebend für die Geschwindigkeit der Inhibierungsreaktion<sup>8</sup>. Die kürzeste Dermatansulfateinheit mit Einfluss auf die Aktivität von HCII ist ein Dodekasaccharid<sup>9</sup>. Für dessen starke Bindung an HCII ist ein Hexasaccharidmotiv verantwortlich, das aus drei identischen Disaccharideinheiten besteht. Diese sind aus Iduronsäure und N-Acetylgalaktosamin aufgebaut, die an der Position 2 bzw. 4 sulfatiert sind<sup>10</sup>. Solche spezifischen Disaccharidcluster sind selten und

---

<sup>1</sup> Iozzo, 1998; Kjellen & Lindahl, 1991

<sup>2</sup> Björk & Lindahl, 1982; Tollefsen *et al.*, 1982

<sup>3</sup> Lindahl *et al.*, 1980; Casu *et al.*, 1981; Choay *et al.*, 1983; Atha *et al.*, 1985; Oscarsson *et al.*, 1989

<sup>4</sup> Lane *et al.*, 1984; Shore *et al.*, 1989

<sup>5</sup> Hurst *et al.*, 1983

<sup>6</sup> Sié *et al.*, 1988; Petitou *et al.*, 1988

<sup>7</sup> Maimone & Tollefsen, 1988; Sié *et al.*, 1988; Bray *et al.*, 1989

<sup>8</sup> Scully *et al.*, 1988; Mascellari *et al.*, 1993

<sup>9</sup> Tollefsen *et al.*, 1986

<sup>10</sup> Maimone & Tollefsen, 1990

kommen in Dermatansulfat zu weniger als 2 % vor. Dies deutet darauf hin, dass HCII Dermatansulfat selektiver bindet als Heparin <sup>1</sup>.

## 2.4 Physiologie von HCII

Aktivatoren von ATIII sind Heparin und Heparansulfat, wohingegen HCII zusätzlich durch Dermatansulfat und weitere polyanionische Glykosaminoglykane aktiviert werden kann <sup>2</sup>. Für die Aktivierung der Hemmung von Thrombin durch ATIII oder HCII kommen *in vivo* nur heparansulfat- und dermatansulfatartige Glykosaminoglykane in Betracht. Heparin befindet sich nicht im Plasma oder in Geweben, sondern liegt intrazellulär in Mastzellen vor. Heparansulfat und Dermatansulfat liegen als Bestandteile von Proteoglykanen auf Zelloberflächen oder in der ECM vor. Dabei weisen beide Glykosaminoglykane eine unterschiedliche Gewebsverteilung auf <sup>3</sup>. Dies lässt vermuten, dass auch ATIII und HCII eine variierende Ortsselektivität bezüglich ihrer Wirkung gegen Thrombin besitzen. Dermatansulfat-Proteoglykane befinden sich in der ECM von Arterienwänden und der Haut, sowie im Knorpel- und Knochengewebe <sup>4</sup>. Auch die Plazenta ist reich an Dermatansulfat-Proteoglykanen, die in der ECM gebunden vorliegen <sup>5</sup>. In diesem Organ ist Thrombin in etwa gleichen Anteilen durch HCII und ATIII inaktiviert <sup>6</sup>. Im Blut von Schwangeren liegt Dermatansulfat in höheren Konzentrationen vor, ebenso sind die Konzentrationen von HCII und des HCII/Thrombin-Komplexes erhöht <sup>7</sup>. Doch ist HCII weniger in die Regulation der Hämostase des Blutkreislaufs involviert als ATIII, da in der Zirkulation hauptsächlich Heparansulfate den Großteil der löslichen Glykosaminoglykane ausmachen <sup>8</sup>.

Die physiologische Bedeutung von HCII ist bislang nicht klar. Bei HCII-Defizienz konnte kein signifikantes Thromboserisiko beobachtet werden <sup>9</sup>. Andere Studien lassen vermuten, dass HCII an der Verhinderung arterieller Thrombosen <sup>10</sup> oder atherosklerotischer Prozesse beteiligt ist <sup>11</sup>. Auch besteht die Möglichkeit, dass HCII die Inhibierung von Fibrin-gebundenem Thrombin reguliert <sup>12</sup>. Da solches Thrombin resistent gegen Heparin-

---

<sup>1</sup> Bourin & Lindahl, 1993

<sup>2</sup> Klauser, 1991; Hayakawa *et al.*, 1995; Hayakawa *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1997; Pavao *et al.*, 1998; Colwell *et al.*, 1999; Weitz *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>b</sup>

<sup>3</sup> Gomes & Dietrich, 1982

<sup>4</sup> Shirk *et al.*, 1996

<sup>5</sup> Delorme *et al.*, 1998

<sup>6</sup> Kamp *et al.*, 2001

<sup>7</sup> Andersson *et al.*, 1992; Andrew *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 1996

<sup>8</sup> Hatton *et al.*, 1999

<sup>9</sup> Villa *et al.*, 1999; Corral *et al.*, 2004

<sup>10</sup> Tollefsen, 2002; He *et al.*, 2002

<sup>11</sup> Aihara *et al.*, 2004; Takamori *et al.*, 2004

<sup>12</sup> Gandossi *et al.*, 1998

Antikoagulantien ist, kann es nicht von ATIII inhibiert werden<sup>1</sup>. ATIII inhibiert Thrombin über einen verbrückten ternären Komplex mit Heparin. Dabei muss an der Protease die Exosite II zugänglich sein, die bei Fibrin-gebundenen Thrombin jedoch blockiert ist<sup>2</sup>. HCII inhibiert Thrombin nicht durch die Bildung eines ternären Komplexes mit Heparin, sondern interagiert direkt über einen allosterischen Mechanismus mit der Protease (siehe Abbildung 2.1-3). Dadurch ist HCII in der Lage auch Fibrin-gebundenes Thrombin in Gegenwart von Dermatansulfat-Proteoglykanen zu hemmen<sup>3</sup>. Die Entdeckung oder das Design spezieller HCII-Aktivatoren könnten eine Ergänzung oder eine Alternative bei der Behandlung von bestimmten Thrombosen darstellen, die resistent gegenüber der Behandlung mit Heparin-aktiviertem ATIII sind<sup>4</sup>.

---

<sup>1</sup> Olson & Björk, 1991

<sup>2</sup> Hogg & Jackson 1989; Hotchkiss *et al.*, 1994; Becker *et al.*, 1999

<sup>3</sup> Bendayan *et al.*, 1994; Zammit & Dawes, 1995; Liaw *et al.*, 2001

<sup>4</sup> Brister *et al.*, 1994; DiCarlo *et al.*, 1999

## 2.5 Ziele der Arbeit

HCII ist ein Antagonist der multifunktionellen Serinprotease Thrombin. Die inhibitorische Aktivität von HCII gegenüber Thrombin wird durch Glykosaminoglykane wie Heparin, Heparansulfat oder Dermatansulfat um mehrere Größenordnungen gesteigert. Für den Verlauf der Glykosaminoglykan-aktivierten Hemmung ist ein vielstufiger allosterischer Mechanismus vorgeschlagen worden, der Konformationsänderungen am Inhibitormolekül postuliert. Diesem Modell entsprechend soll im nativen Serpin die Glykosaminoglykan-Bindestelle durch eine intramolekulare Wechselwirkung mit dem N-Terminus des Moleküls verdeckt sein. Durch Bindung von Glykosaminoglykanen soll der N-Terminus aus seiner Position verdrängt werden. Diese durch die Glykosaminoglykane initiierten strukturellen Änderungen werden als eine notwendige Voraussetzung angesehen, damit der N-Terminus von HCII eine Exosite-Wechselwirkung mit Thrombin herstellen und somit nach Bildung eines bizentrischen Michaelis-Komplexes eine effektive Inhibition der Protease erfolgen kann. Die intramolekulare Bindung des N-Terminus an die Glykosaminoglykan-Bindestelle von HCII war lange Zeit das akzeptierte Modell für die Struktur von nativem HCII. Dieses Modell wurde jedoch in den letzten Jahren durch Röntgenstrukturuntersuchungen von HCII, die jedoch die Position des N-Terminus nicht wiedergeben konnten, angezweifelt.

Ziel dieser Arbeit war es, einen Beitrag zur Aufklärung der Struktur des nativen HCII-Moleküls und zur Bedeutung des N-Terminus für den Reaktionsmechanismus zu leisten. Zwei verschiedene Ansätze zur Demonstration von Funktion und Position des N-Terminus sollten zu diesem Zweck verfolgt werden. Einerseits sollte der Einfluss von Zinkionen auf die Affinität zu Glykosaminoglykanen analysiert werden und andererseits sollte die Auswirkung einer kovalenten Fixierung des N-Terminus von HCII auf die Hemmung von Thrombin untersucht werden.

Zu den postulierten Charakteristika von HCII gehört die Annahme einer Konkurrenz zwischen der intramolekularen Bindung des N-Terminus an die basische  $\alpha$ -Helix D und die Bindung von Glykosaminoglykanen an diese Domäne. Verschiedene Hinweise deuteten darauf hin, dass weitere Kofaktoren existieren, die die Glykosaminoglykan-Affinität von HCII und somit den beschriebenen allosterischen Verdrängungsmechanismus modulieren. Im HCII-Molekül liegen Sequenzen vor, die eine Wechselwirkung mit Zinkionen vermuten lassen. So besitzt HCII einerseits ein Histidin-reiches Motiv, das Analogien zu Zink-bindenden Motiven in anderen Proteinen aufweist. Andererseits ist die Bindung von Zinkionen durch *Cluster* negativ geladener Aminosäuren bekannt, wie sie auch im N-Terminus von HCII vorliegen. Daher sollte die Wirkung von Zink- und anderen Kationen auf die Interaktion von HCII mit Heparin untersucht werden. Weiterhin sollte der Einfluss, den die Kationen möglicherweise auf die Struktur von HCII haben, durch Messung der intrinsischen Proteinfluoreszenz bestimmt werden. Änderungen des Emissionsspektrums würden einen direkten Beleg für die Interaktion zwischen HCII und Zinkionen liefern. Die Identifizierung weiterer Kofaktoren für die Wechselwirkung zwischen HCII und

Glykosaminoglykanen könnte interessante Ansätze zur Entwicklung von pharmakologisch interessanten HCII-Aktivatoren bieten.

Ein zweiter Ansatz zur Bestimmung der Funktion und Position der N-terminalen Domäne von HCII sollte mittels der Expression, Reinigung und Charakterisierung von HCII-Varianten erfolgen, die zwei eingeführte Cysteine an definierten Positionen des N-Terminus und der  $\alpha$ -Helix D besitzen. Die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken zwischen diesen Cysteinen würde den N-Terminus von HCII kovalent fixieren. Die HCII-Varianten sollten durch Bestimmung von kinetischen Parametern der Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin und  $\alpha$ -Thrombin unter oxidierenden und reduzierenden Bedingungen charakterisiert werden.  $\alpha$ -Chymotrypsin sollte dabei zur Kontrolle der Reaktivität der Varianten dienen, da für die Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin der N-Terminus von HCII ohne Bedeutung ist. Im Besonderen war die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Glykosaminoglykanen zu untersuchen. Die Fixierung des N-Terminus würde diese auch für die Glykosaminoglykan-Bindung wichtige Domäne blockieren. Konsequenterweise sollte der Einfluss der Glykosaminoglykane auf die Hemmung von Thrombin bei diesen HCII-Varianten verringert sein oder ganz fehlen. Durch Reduktion der Disulfidbrücke würde sich die Reaktivität der HCII-Varianten wieder herstellen lassen. Durch kinetische Untersuchungen der Hemmung von Thrombin durch die HCII-Varianten unter jeweils oxidierenden oder reduzierenden Bedingungen sollte die Bedeutung des N-Terminus von HCII für den Mechanismus der Inhibition geprüft und Informationen für den Ort der intramolekularen Wechselwirkung des N-Terminus erhalten werden.

# Kapitel 3

## Methoden

### 3.1 Mikrobiologische Methoden

#### 3.1.1 Bakterienstämme und Nährmedien

In dieser Arbeit wurden die beiden Bakterienstämme *E. coli* MC1061/P3 (Invitrogen™, Life Technologies) und Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan (Stratagene) verwendet. *E. coli* MC1061/P3 ist ein Bakterienstamm zur effektiven Transformation von Vektoren, welche das P3 Episom zur Replikation und Selektion benötigen (z.B. pCDM8 oder pcDNA1.1). XL-1 Blue MRF' Kan ist ein restriktionsdefizientes und kanamycinresistentes Derivat des XL-1 Blue Stamms. Zudem ist XL-1 Blue MRF' Kan defizient bezüglich Endonukleasen (*endA*) und unfähig zur Rekombination (*recA*).

Bei den verwendeten Medien handelte es sich um Fertigmedien, denen zur Selektion der Bakterienstämme Antibiotika zugesetzt wurden. Die Pulvermedien wurden in Milli-Q®-Reinstwasser angesetzt und mittels Autoklavieren bei 121 °C und 2 bar sterilisiert. Die steril-filtrierten Antibiotikallösungen wurden nachträglich nach Abkühlung der Medien zugefügt.

**Tabelle 3.1-1:** Bakterienstämme und Medien für die bakterielle Kultivierung

<i>E. coli</i> MC1061/P3 (Invitrogen™, Life Technologies)	F- hsdR (rk-, mk+) araΔ139 Δ(ara ABCleu)7679 galU galK ΔlacX74 rpsL thi mcrB [P3: KanR AmpR (am) TetR (am)]
Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan (Stratagen)	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI <sup>q</sup> ZΔM15 Tn5 (Kan <sup>r</sup> )]
Lennox L Broth Base (Invitrogen™, Life Technologies)	50 % (v/v) SELECT Peptone 140 25 % (v/v) SELECT Hefe Extrakt 25 % (v/v) NaCl
Lennox L Agar (Invitrogen™, Life Technologies)	33,3 % (v/v) SELECT Peptone 140 16,6 % (v/v) SELECT Hefe Extrakt 37,5 % (v/v) SELECT Agar 16,6 % (v/v) NaCl

**Tabelle 3.1-1:** (Fortsetzung)

LB-Medium	20 g/L Lennox L Broth Base
LB-Medium-TC/Amp	20 g/L Lennox L Broth Base 7,5 µg/mL Tetracyclin 50 µg/mL Ampicillin
LB-Medium-Amp	20 g/L Lennox L Broth Base 100 µg/mL Ampicillin
LB-Agar	37 g/L 50 % (v/v) SELECT Peptone 140
LB-Agar-TC/Amp	37 g/L Lennox L Agar 50 µg/mL Ampicillin 7,5 µg/mL Tetracyclin
LB-Agar-Amp	37 g/L Lennox L Agar 100 µg/mL Ampicillin
SOC-Medium	20 g/L Bactotryptone, 5 g/L Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 20 mM $\alpha$ -D-Glukose, pH 6,9

### 3.1.2 Kultivierung und Lagerung von prokaryotischen Zellen

Die Kultivierung prokaryotischer Zellen erfolgte immer ausgehend von einer einzelnen Bakterienkolonie. Die Isolierung einzelner Bakterienklone wurde auf LB-Agar Kulturplatten vorgenommen. Dazu wurden verdünnte Bakterienlösungen mit einem Impfhaken (Drigalski-Spatel) auf LB-Agar Platten ausgestrichen. Nach der Inkubation bei 37 °C im Wärmeschrank erhielt man Bakterienkolonien, welche aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen waren. Sollten transformierte Zellen selektioniert werden, enthielt das Medium entsprechende Antibiotika. Eine einzelne Kolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze in 3 mL LB-Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte im Rollinkubator (Incudrive R, Schütt Labortechnik) bei 37 °C über Nacht. Diese Zelllösung konnte zur Isolierung eines enthaltenen Plasmids (3.2.2.2) oder zum Animpfen eines größeren Kulturvolumens verwendet werden. Die Kultivierung größerer Bakterienvolumina (20-100 mL) erfolgte in sterilen Duranflaschen (100-500 mL) auf einem Orbitalschüttler (Centromat U, B. Braun Biotech) mit 220 U/min bei 37 °C und 40 % rel. Luftfeuchtigkeit. Um über einen längeren Zeitraum auf die verschiedenen Bakterienstämme zugreifen zu können, wurde vom Ausgangsstamm Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan und allen davon durch Transformation abgeleiteten Bakterienstämmen Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurde 2 mL einer Bakterienlösung zentrifugiert und das Pellet in 1 mL LB-Medium mit 20 % (v/v) Glycerin resuspendiert und bei -80 °C eingefroren.

### 3.1.3 Herstellung transformationskompetenter Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan

Um eine Transformation von prokaryotischen Zellen mit Fremd-DNA zu ermöglichen, müssen die Bakterien vorbereitet werden. Ihre Transformationskompetenz können die Zellen

mittels Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{RbCl}$ <sup>1</sup> erhalten. Dazu wurden ca. 60 mL LB-Medium-Amp (Tabelle 3.1-1) mit 1/10 Volumen einer *Epicurian coli* XL-1 Blue Vorkultur angeimpft und bei 37 °C kultiviert. Der Wachstumsverlauf der Bakterien wurde photometrisch verfolgt, bis eine optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge ( $\text{OD}_{600}$ ) von 0,5-0,8 erreicht war (mittlere exponentielle Wachstumsphase). Die Bakterienlösung wurde in 10-mL Chargen in sterile Behältnisse überführt und bei 4 °C zentrifugiert (5000 x g). Das erhaltene Zellpellet wurde jeweils mit 5 mL steriler, 4 °C kalter  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (50 mM) resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 1 mL  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen. Die so gewonnenen Zellen können bei 4 °C gelagert werden und sind so bis zu 48 Stunden transformationskompetent. Alternativ kann der Zelllösung auch 20 % (v/v) Glycerin zugefügt werden, um die Transformationskompetenz bei -80 °C für ca. vier Wochen zu erhalten.

### 3.1.4 Transformation von *Epicurian coli* XL-1 Blue MRF' Kan mit $\text{CaCl}_2$

Viele Bakterienarten, zu denen auch *Bacillus subtilis* gehört, bilden eine natürliche Kompetenz zur Aufnahme von Fremd-DNA aus<sup>2</sup>. Im Gegensatz dazu müssen *E. coli*-Zellen mittels geeigneter Methoden transformiert werden. Dazu zählen physikalische Methoden wie die Elektroporation<sup>3</sup> oder chemische Behandlung mit  $\text{CaCl}_2$  oder  $\text{RbCl}$ <sup>1</sup>. Der hier verwendete *E. coli*-Stamm *Epicurian coli* XL-1 Blue MRF' Kan erhielt seine Kompetenz durch Inkubation in  $\text{CaCl}_2$ -Lösung (3.1.3). Die Transformation wurde auf Eis in einem 1,5 mL Standardreaktionsgefäß durchgeführt. 50 µL der kompetenten Zellen wurden mit 1 µL  $\beta$ -Mercaptoethanol versetzt und es wurden 5-10 µL einer DNA-Ligationsreaktion zugesetzt (3.2.6). Zur Transformationskontrolle wurden in der gleichen Weise kompetente Zellen mit 0,1 µL eines Standardplasmids behandelt. Der Reaktionsansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Hitzeschockbehandlung im Wasserbad bei 42 °C für 45 Sekunden. Nachfolgend wurden die Zellen auf Eis abgekühlt (ca. 1 Minute) und dann mit 250 µL vorgewärmtem (37 °C) SOC-Medium (Tabelle 3.1-1) versetzt. Die Zelllösung wurde für 1-2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und nach dieser Zeit in verschiedenen Mengen auf LB-Agar-Amp Platten (3.1.1) ausgestrichen. Die Inkubation dieser Platten erfolgte über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C. Da die Antibiotikaresistenz durch den transformierten Vektor (3.2.7) vermittelt wurde, konnten transformierte Zellen mit Hilfe ihrer Resistenz gegen Ampicillin selektioniert werden. Einzelne Zellkolonien wurden auf neue LB-Agar-Amp Platten überführt und nach Plasmidisolierung (3.2.2.2) mittels Restriktionspaltung (3.2.4) weiter analysiert.

---

<sup>1</sup> Dagert & Ehrlich, 1979; Cohen *et al.*, 1972

<sup>2</sup> Dubnau, 1991

<sup>3</sup> Dower *et al.*, 1988; Taketo, 1988

## 3.2 Molekularbiologische Methoden

### 3.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente. Die negativ geladene DNA wandert in einem Gleichspannungsfeld in Abhängigkeit ihrer Größe und ihrer Konformation mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Bei linearer DNA ist die Wanderungsgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Logarithmus der Molekularmasse der DNA<sup>1</sup>. Die Geschwindigkeit der Elektrophorese wird von der Gelkonzentration, der Leitfähigkeit des Puffers und der Stärke des elektrophoretischen Feldes beeinflusst<sup>2</sup>. Die Detektion der DNA erfolgt mit Hilfe von Ethidiumbromid (Homidiniumbromid, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenyl-phenanthridiniumbromid), ein interkalierender Farbstoff, der sich zwischen die Guanin/Cytosin Basenpaare einlagert und mit diesen einen Komplex bildet. Der Komplex ist durch UV-Licht (312 nm) anzuregen und fluoresziert im längerwelligen, orangefarbenen Spektralbereich (590 nm)<sup>3</sup>.

**Tabelle 3.2-1:** Lösungen der Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 8,0
Auftragspuffer (10x)	50 % (v/v) Glycerin, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 0,1 % (w/v) Xylencyanol, 0,1 M EDTA, in TAE-Puffer
Lade/Lysepuffer	20 % (w/v) Ficoll 400, 100 mM EDTA, 0,1 % (w/v) SDS, 0,5 mg/mL RNase A, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, in H <sub>2</sub> O/Phenol/Chloroform (1:1:1, Volumenanteile)
Ethidiumbromidlösung	40 µg/L Ethidiumbromid in H <sub>2</sub> O

Die Agarosegelelektrophorese wurde nach Bedarf mit 0,7-2,5 %igen (w/v) Agarosegelen durchgeführt. Dazu wurde die Agarose in 1-fach TAE-Puffer aufgeköcht und in eine horizontale Flachbett-Apparatur gegossen. Die Probenfächer wurden mit einem eingesetzten Probenkamm vorgebildet. Die zu untersuchenden DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen eines 10-fach konzentrierten Auftragspuffers verdünnt und in die Probenfächer gegeben. Parallel wurde ein DNA-Größenstandard (1 kb-Leiter, GeneCalf) verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 1-fach TAE-Puffer und die elektrophoretische Trennung erfolgte mit 20 V/cm. Nachfolgend wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung inkubiert, gewässert und die DNA im UV-Licht detektiert. Die Dokumentation erfolgte elektronisch unter Verwendung einer CCD-Videokamera (MWG-Biotech) und der Steuerungssoftware Photofinish (Vers. 3.0, Zsoft).

<sup>1</sup> Maniatis *et al.*, 1975; McDonnell *et al.*, 1977; Kozulic, 1995

<sup>2</sup> Sambrook *et al.*, 1989

<sup>3</sup> Sharp *et al.*, 1973

## 3.2.2 DNA-Isolierung und Reinigung

### 3.2.2.1 Plasmid-Schnell-Charakterisierung

Eine Plasmid-Schnell-Charakterisierung ist eine Methode zur Identifizierung von Plasmiden über ihre ccc-Plasmidform (*covalently closed circular*)<sup>1</sup>. Dazu wird eine dicht bewachsene Bakterienkolonie oder 30 µL einer entsprechenden Bakterienlösung mit 30 µL Lade/Lysepuffer (Tabelle 3.2-1) versetzt. Die Lösung wird gemischt (vortexen) und danach zentrifugiert (13000 x g). 15 µL der oberen Lösung können für eine Agarosegelelektrophorese verwendet und direkt aufgetragen werden. Ein Plasmid mit einem ligierten Insert kann mittels seiner Größe identifiziert werden.

### 3.2.2.2 Plasmidisolierung mittels Quantum Prep<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit

Das Quantum Prep<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit dient der schnellen Reinigung von Plasmid-DNA aus 1-2 mL Bakterienlösung. Die DNA-Isolierung basiert auf einer alkalischen Lyse der Zellen<sup>2</sup>, verzichtet aber auf organische Lösungsmittel. Statt dessen kommt eine DNA-bindende Silica-Matrix zum Einsatz, an deren Oberfläche die DNA in Gegenwart chaotroper Salze präzipitiert<sup>3</sup>. Nach der Lyse werden Zellbestandteile durch Zentrifugation entfernt und die Plasmid enthaltende Lösung mit der Matrix versetzt. Nach einigen Waschschritten kann die DNA mit basischen Puffern (20 mM Tris-HCl, pH 8,5) eluiert werden. Die Durchführung der Plasmidisolierung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Bio-Rad Laboratories)<sup>4</sup>.

### 3.2.2.3 Plasmidisolierung mittels QIAGEN Plasmid Midi Kit

Um größere DNA-Mengen zu generieren wurde das Plasmid Midi Kit der Firma QIAGEN verwendet. Es ermöglicht die Isolation von bis zu 100 µg Plasmid DNA aus 25 mL einer Bakteriensuspension. Die verwendete Methode basiert auf einer alkalischen Lyse und der Bindung der Plasmide an einen Anionentauscher (QIAGEN-tip 100). Dadurch wurden reproduzierbare Mengen hochreiner Plasmid-DNA aus transformierten Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan (3.1.4) gewonnen. Nach Linearisierung (3.2.4) und Konzentrierung (3.2.2.6) konnte die DNA zur Transfektion der CHO-DUKX-B1-Zellen (3.3.5) eingesetzt werden. Die Plasmidisolation erfolgte entsprechend den Herstellerangaben<sup>5</sup>.

---

<sup>1</sup> Davis *et al.*, 1999; Barnes, 1977

<sup>2</sup> Birnboim & Doly, 1979

<sup>3</sup> Hamaguchi & Geiduschek, 1962

<sup>4</sup> Instruction Manual, Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit, Rev F, Bio-Rad Laboratories, 2001

<sup>5</sup> QIAGEN Plasmid Purification Handbook, QIAGEN, 2003

### 3.2.2.4 DNA-Isolierung mittels QIAGEN Gel Extraction Kit

Die Aufreinigung von Restriktionsfragmenten wurde mit Hilfe eines Geextraktions Kits vorgenommen. Nach elektrophoretischer Auftrennung im Agarosegel und Detektion der Restriktionsfragmente durch Ethidiumbromid (3.2.1) wurde die gewünschte DNA-Bande mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten. Zur Isolierung der DNA aus der Agarosematrix wurde das Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN verwendet. Die Methode basiert auf Lösung des Gelstücks und der Bindung der DNA an eine Silica-Matrix unter Hochsalzbedingungen<sup>1</sup>. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers<sup>2</sup>.

### 3.2.2.5 DNA-Isolierung mittels QIAquick PCR Purification Kit

Zur Vorbereitung der Transfektion von CHO-DUKX-B1-Zellen (3.3.4) wurden die zu transfizierenden Plasmide durch Restriktionsspaltung linearisiert (3.2.4). Die Isolierung und Reinigung der linearisierten DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification Kit vorgenommen. Dieses Kit eignet sich zur Isolierung von DNA in einem Größenbereich von 100 Bp bis zu 10 kB. Die Reinigung eines Restriktionsansatzes wurde analog zu einem PCR-Ansatz vorgenommen, entsprechend den Vorgaben des Herstellerprotokolls<sup>2</sup>. Vor der Transfektion wurde die DNA konzentriert und umgepuffert (3.2.2.6).

### 3.2.2.6 Reinigung und Konzentrierung von DNA mittels ethanolischer Fällung

Zur Konzentrierung und Reinigung von DNA wurde diese einer ethanolischen Fällung unterzogen. Dazu wurde eine DNA-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,2) versetzt. Es wurden 2-3 Volumenteile Ethanol p.a. (98 %ig) zugefügt, die Lösung durchmischt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zentrifugation (30 Minuten, 13000 x g) wurde ein DNA-Präzipitat erhalten, das nach Entfernung des Überstandes mit 70 %igem Ethanol (-20 °C) überschichtet wurde. Nach erneuter Zentrifugation wurde der ethanolische Überstand verworfen und die DNA unter einer Reinraumwerkbank an der Luft getrocknet. Nachdem das Ethanol vollständig entfernt war, wurde die DNA in PBS aufgenommen und bei -20 °C bis zur Verwendung aufbewahrt.

---

<sup>1</sup> Vogelstein & Gillespie, 1979

<sup>2</sup> QIAquick Spin Handbook, QIAGEN, 2002

### 3.2.3 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte spektroskopisch in einem UV/VIS-Spektrophotometer (UV-1602, Shimadzu) gegen das Lösungsmittel der DNA als Referenz. Gemessen wurde beim gemittelten Extinktionsmaximum der Nukleotide bei 260 nm in Quarzküvetten mit 10 mm Schichtdicke. Grundlage der Konzentrationsbestimmung mittels Extinktion ist das Lambert-Beersche Gesetz das hier, aufgrund der unbestimmten Nukleotidzusammensetzung von DNA, in vereinfachter Form angewendet wurde. Eine Extinktion bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) von 1,0 entspricht demnach einer DNA-Konzentration von 50  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  doppelsträngiger (ds) DNA.

$$c_{\text{dsDNA}} [\mu\text{g}/\text{mL}] = OD_{260} \cdot 50 \mu\text{g}/\text{mL}$$

Die Reinheit der DNA wurde durch den Quotienten der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm Wellenlänge ermittelt. Lösungen mit Verunreinigungen von Proteinen zeigen eine höhere Extinktion bei 280 nm, bedingt durch Anregungen der Seitenketten aromatischer Aminosäuren. Reine DNA-Lösungen haben einen Quotienten  $\geq 1,8$ .

### 3.2.4 Restriktionsspaltung

Linearisierung von Plasmid DNA oder ihre Fragmentierung, wie auch die Analyse einer Ligation und ihres Inserts wurden mit Hilfe hydrolytischer Spaltung unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Es wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II verwendet, die innerhalb ihrer Erkennungssequenz spalten. Diese Erkennungssequenz beruhte aus Palindromen von Tetra-, Penta- oder Hexanukleotidsequenzen. Je nach verwendeter Nuklease kann die Restriktion von DNA zu Fragmenten mit glatten Enden (engl. *blunt ends*) oder versetzten Enden (engl. *sticky ends*) führen. Die Restriktion der DNA erfolgte in den vom Hersteller (New England Biolabs, Genecraft) mitgelieferten Puffersystemen. Inkubationsdauer und -temperatur variierten zwischen 30 Minuten und 2 Stunden, bzw. 24 und 37 °C in Abhängigkeit von der verwendeten Nuklease. Die Restriktionsenzyme wurden nach Ende der Spaltung durch 10-minütige Inkubation bei 65 °C hitzeinaktiviert. Zur Restriktion wurden 10 Units der jeweiligen Endonuklease eingesetzt, wobei das zugeführte Volumen aufgrund des enthaltenen Glycerins 20 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten sollte. Die Restriktionsspaltung wurde durch Agarosegelelektrophorese (3.2.1) analysiert oder die Spaltprodukte zur weiteren Verwendung isoliert (3.2.2.4 und 3.2.2.5). Ein Restriktionsansatz hatte in der Regel ein Volumen von 10  $\mu\text{L}$ , seine Zusammensetzung ist in nachfolgender Tabelle (3.2-2) angegeben.

**Tabelle 3.2-2:** Bedingungen der Restriktionsspaltungen

Endonuklease	Erkennungssequenz	Restriktionsansatz	Bedingungen
<i>EcoRI</i>	5'...G <sup>▼</sup> AATTC...3'	8,5 µL DNA-Lösung 1 µL Puffer NEB 4 (10x) 0,5 µL <i>EcoRI</i> (10 U)	2 Stunden 37 °C
<i>HindIII</i>	5'...A <sup>▼</sup> AGCTT...3'	8,5 µL DNA-Lösung 1 µL Puffer NEB 2 (10x) 0,5 µL <i>HindIII</i> (10 U)	2 Stunden 37 °C
<i>PstI</i>	5'...CTGCA <sup>▼</sup> G...3'	8,4 µL DNA-Lösung 1 µL Puffer NEB 3 (10x) 0,1 µL BSA (100x) 0,5 µL <i>PstI</i> (10 U)	2 Stunden 37 °C
<i>SmaI</i>	5'...CCC <sup>▼</sup> GGG...3'	8,5 µL DNA-Lösung 1 µL Puffer NEB 4 (10x) 0,5 µL <i>SmaI</i> (10 U)	2 Stunden 24 °C
<i>ScaI</i>	5'...AGT <sup>▼</sup> ACT...3'	8 µL DNA-Lösung 1 µL Puffer NEB 3 (10x) 1 µL <i>ScaI</i> (10 U)	2 Stunden 37 °C
Puffersystem			
Puffer NEB 2 (10x)	10 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, pH 7,9		
Puffer NEB 3 (10x)	50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, pH 7,9		
Puffer NEB 4 (10x)	20 mM Tris-Acetat, 50 mM Kaliumacetat, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 mM DTT, pH 7,9		

### 3.2.5 Dephosphorylierung von DNA

Bei der Restriktionsspaltung von DNA durch Endonukleasen entstehen 3'-Hydroxyl-, wie auch 5'-Phosphatenden. Die 5'-Phosphatenden wurden unter Verwendung einer alkalischen Phosphatase aus arktischen Garnelen (*P. borealis*) hydrolysiert. Eine Ligation zwischen den beiden Enden dieses DNA-Fragments mit Hilfe der T4-DNA-Ligase war damit nicht mehr möglich. Nur eine Ligase-katalysierte Reaktion zwischen dem dephosphorylierten Fragment und einem unbehandelten Fragment konnte noch stattfinden. Die Dephosphorylierung wurde mit dem linearisierten Vektor nach vollständiger Spaltung und Reinigung durchgeführt. Die behandelte DNA wurde nach Hitzeinaktivierung der Phosphatase direkt in der Ligationsreaktion benutzt.

**Tabelle 3.2-3:** Bedingungen der Dephosphorylierung mittels alkalische Phosphatase

Dephosphorylierungsreaktion	50 ng DNA in 8 µL 1 µL Dephosphorylierungspuffer (10x) 1 µL <i>alkaline phosphatase, shrimp</i> (Roche Diagnostics)	2 Stunden 37 °C
Inaktivierung der Phosphatase		15 Minuten 65 °C
Dephosphorylierungspuffer (10x)	0,5 M Tris-HCl, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,5	

### 3.2.6 Ligation

Ligationsreaktionen wurden mit der rekombinant hergestellten T4-DNA-Ligase des Bakteriophagen T4 durchgeführt. Die Ligase katalysiert die Ausbildung neuer Phosphoesterbindungen zwischen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente<sup>1</sup>. Die Ligation diente der Konstruktion verschiedener Vektoren, welche auf dem eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) basierten. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug etwa eins zu drei, bei einem Gesamtvolumen der Ligationsreaktion von 10 µL. Die Bedingungen der Ligation sind in Tabelle 3.2-4 angegeben.

**Tabelle 3.2-4:** Bedingungen der Ligationsreaktion

dephosphorylierter Vektor [pcDNA3.1(+)]	0,5 µL	
DNA-Insert	3 µL	
T4-DNA-Ligase (Roche Diagnostics)	1 µL (1 Weiss Unit)	
Ligationspuffer (10x)	1 µL	
ATP (10 mM)	1 µL	
ddH <sub>2</sub> O	3,5 µL	Inkubation 16 Stunden 14 °C
Ligationspuffer (10x)	0,6 M Tris-HCl, 0,1 M MgCl <sub>2</sub> , 10 mM DTT, 10 mM ATP, pH 7,6	

### 3.2.7 Konstruktion der Expressionsvektoren

Zur Gewinnung größerer Mengen an rekombinanten Proteinen aus tierischen Zellen war es nötig stabile Expressionssysteme zu generieren. Die für die sechs HCII-Varianten kodierenden Gene waren bereits vorhanden und befanden sich in dem Vektorsystem pCDM8<sup>2</sup>. Dieser Vektor ermöglichte zwar eine Expression im COS7-Zellsystem, eine Selektion positiv transfizierter Zellen war aber nicht möglich, da der Vektor über kein Resistenzgen verfügt<sup>3</sup>. Für eine stabile Expression wurden die für die HCII-Varianten kodierenden Gene in den Vektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) überführt. pcDNA3.1(+) ist ein 5428 Bp großer Shuttlevektor mit einem bakteriellen Replikationsursprung und einer β-Laktamase-vermittelten Ampicillinresistenz. Dies ermöglicht die Selektion transformierter Bakterienklone. Das in die *multiple cloning site* (MCS) integrierte Fremdgen steht unter der Kontrolle des *immediate early*-Promotors des menschlichen Cytomegalievirus (CMV). Die Herstellung stabiler eukaryotischer Zellklone wird durch ein Neomycinresistenzgen ermöglicht<sup>4</sup>. Das Gen kodiert für eine Phosphotransferase, die eine Resistenz gegen das Aminoglykosid Neomycin und Derivate wie Geneticin (G418) vermittelt.

<sup>1</sup> Weiss *et al.*, 1968

<sup>2</sup> Brinkmeyer, 2001

<sup>3</sup> Seed, 1987

<sup>4</sup> Page & Sydenham, 1991; Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; van Hove *et al.*, 1996

Die pCDM8 Vektoren enthielten jeweils die cDNA der HCII-Varianten mit einer Gesamtgröße von 2081 Basenpaaren<sup>1</sup>, bestehend aus der gesamten Protein-kodierenden Region, inklusive Signalpeptid und Polyadenylierungssignal. Variationen der HCII-cDNA wurden mittels PCR-Mutagenese erzeugt<sup>2</sup>. Eine Übersicht der HCII-Varianten und ihrer Codonmutationen ist in Tabelle 3.2-5 wiedergegeben.

**Tabelle 3.2-5:** Nukleotid- und Aminosäureänderungen der Varianten von humanen HCII

Variante	Aminosäureposition (Codonmutation)			
pHCII F195C	Phe195	(TTT)	→	Cys195 (TGC)
	Gly196	(GGG)	→	Gly196 (GGC)
pHCII ΔC	Cys273	(TGC)	→	Ser273 (TCC)
	Gly278	(GGA)	→	Gly278 (GGT)
	Leu321	(CTG)	→	Leu321 (CTA)
	Cys323	(TGC)	→	Ser323 (TCC)
	Cys467	(TGC)	→	Ser467 (TCC)
pHCII ΔC/F195C	Phe195	(TTT)	→	Cys195 (TGC)
	Gly196	(GGG)	→	Gly196 (GGC)
	Cys273	(TGC)	→	Ser273 (TCC)
	Gly278	(GGA)	→	Gly278 (GGT)
	Leu321	(CTG)	→	Leu321 (CTA)
	Cys323	(TGC)	→	Ser323 (TCC)
pHCII ΔC/F195C/P52C	Thr47	(ACC)	→	Thr47 (ACT)
	Pro52	(CCA)	→	Cys52 (TGT)
	Phe195	(TTT)	→	Cys195 (TGC)
	Gly196	(GGG)	→	Gly196 (GGC)
	Cys273	(TGC)	→	Ser273 (TCC)
	Gly278	(GGA)	→	Gly278 (GGT)
	Leu321	(CTG)	→	Leu321 (CTA)
	Cys323	(TGC)	→	Ser323 (TCC)
pHCII ΔC/F195C/G54C	Thr47	(ACC)	→	Thr47 (ACT)
	Gly54	(GGG)	→	Cys54 (TGT)
	Phe195	(TTT)	→	Cys195 (TGC)
	Gly196	(GGG)	→	Gly196 (GGC)
	Cys273	(TGC)	→	Ser273 (TCC)
	Gly278	(GGA)	→	Gly278 (GGT)
	Leu321	(CTG)	→	Leu321 (CTA)
	Cys323	(TGC)	→	Ser323 (TCC)
	Cys467	(TGC)	→	Ser467 (TCC)
	pHCII ΔC/F195C/S68C	Gly54	(GGG)	→
Phe67		(TTC)	→	Phe67 (TTT)
Phe195		(TTT)	→	Cys195 (TGC)
Gly196		(GGG)	→	Gly196 (GGC)
Cys273		(TGC)	→	Ser273 (TCC)
Gly278		(GGA)	→	Gly278 (GGT)
Leu321		(CTG)	→	Leu321 (CTA)
Cys323		(TGC)	→	Ser323 (TCC)
Cys467	(TGC)	→	Ser467 (TCC)	

<sup>1</sup> Ragg & Preibisch, 1988

<sup>2</sup> Brinkmeyer, 2001

Flüssigkulturen der *E. coli* MC1061/P3 Bakterienstämme wurden in LB-Medium-TC/Amp (Tabelle 3.1-1) kultiviert und die Vektoren durch Plasmidisolierung (3.2.2.2) gewonnen. Die für die HCII-Varianten kodierenden cDNAs wurden aus den Vektoren (Tabelle 3.2-5) durch *EcoRI* Restriktionsspaltung (3.2.4) isoliert. Mittels Spaltung wurden zwei Fragmente mit 4887 und 1684 Bp erhalten. Die beiden Spaltstellen liegen im nicht kodierenden Bereich der HCII-cDNA. Die 5'-Schnittstelle ist der HCII-cDNA vorgelagert und liegt im CMV-Promotor des pCDM8 Vektors, die 3'-Schnittstelle liegt im natürlichen Polyadenylierungssignal der HCII-cDNA. Der Vektor pcDNA3.1(+) besitzt ein eigenes Polyadenylierungssignal, so dass auf das HCII-eigene verzichtet werden konnte. Die durch *EcoRI*-Restriktionsspaltung erhaltenen Fragmente wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das 1684 Bp Fragment aus dem Gel gereinigt (3.2.2.4). Parallel wurde pcDNA3.1(+) über seine singuläre *EcoRI*-Spaltstelle linearisiert (3.2.4) und über Gelelektrophorese isoliert (3.2.1). Das 5'-Spaltende wurde dephosphoryliert (3.2.5) und mit der 1648 Bp großen HCII-cDNA in einer Ligationsreaktion eingesetzt (3.2.6). Durch nachfolgende Transformation (3.1.4) von *Escherichia coli* XL-1 Blue MRF' Kan, wurden mittels Selektion auf LB-Agar-Amp Platten (Tabelle 3.1-1) Einzelkolonien erhalten, die durch Plasmid-Schnell-Charakterisierung (3.2.2.1) untersucht wurden. Von Bakterienkolonien, die ein Plasmid der erwarteten Größe enthielten, wurde eine Flüssigkultur angelegt und eine Plasmidisolierung (3.2.2.2) durchgeführt. Zur Kontrolle der Insertion und der Orientierung des einligierten HCII-Gens im Vektor wurden Restriktionsspaltungen (3.2.4) mit den Endonukleasen *EcoRI*, *HindIII*, *PstI* und *SmaI* durchgeführt.

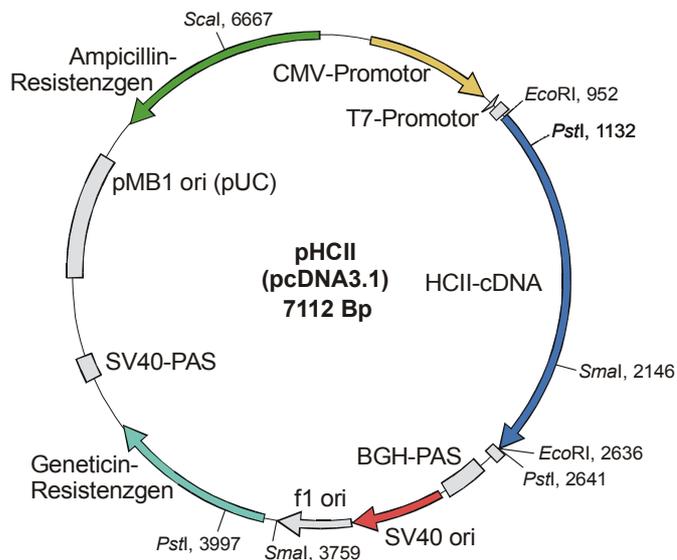


Abbildung 3.2-1: Elemente der eukaryotischen Expressionsvektoren pHCI1 auf der Basis von pcDNA3.1(+)

CMV-Promotor: „immediate early“-Promotor des menschlichen Cytomegalievirus

T7-Promotor: Promotor des Bakteriophagen T7  
BGH-PAS: „bovine growth hormone“ Polyadenylierungssignal

f1 ori: f1-Phagen Replikationsursprung

SV40-PAS: SV40 Polyadenylierungssignal

pMB1 ori: bakterieller Replikationsursprung

Die Nummerierung ist durchgehend. Die Markierungen geben die Positionen der Erkennungssequenzen der Endonukleasen an.

### 3.3 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung beschreibt den Vorgang der *in vitro* Vermehrung von tierischen und pflanzlichen Zellen. Anders als primäre Zellen sind Zelllinien mittels zufälliger oder gezielter genetischer Veränderungen zu nahezu unendlicher Reproduktion befähigt. Eine Zelllinie dient als Quelle großer Zellzahlen eines einheitlichen Typs. Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter Reinstbedingungen in partikelfreier Umgebung durchgeführt unter Einhaltung geltender Sicherheitsbestimmungen der Sicherheitsstufe S1 und in Übereinstimmung mit den gesetzlichen Auflagen.

#### 3.3.1 Zelllinien und Kulturmedien

Die Zelllinie CHO-DUKX-B1 (ATCC CRL-9010) ist eine Variante der prolindefizienten Zelllinie CHO-K1 (ATCC CCL-61). CHO-K1<sup>1</sup> ist ein Derivat einer Zelllinie, welche 1957 von T. Puck aus einer somatischen Zelle aus Eierstockgewebe eines chinesischen Hamsters (engl. *Chinese Hamster Ovary cells*) etabliert wurde<sup>2</sup>. CHO-DUKX-B1 ist eine weitergehende Variante von CHO-K1, welche keine Dihydrofolatreduktase (Tetrahydrofolat-Dehydrogenase) Aktivität besitzt<sup>3</sup>. Dieses Enzym ist für die Bildung von Tetrahydrofolsäure verantwortlich, die bei verschiedenen Zellstoffwechselfvorgängen von Bedeutung ist. Eine zentrale Rolle nimmt sie bei der Synthese von Nucleinsäurevorstufen und Aminosäuren ein. Dihydrofolatreduktase-(DFHR)-defiziente Zellen benötigen die Zugabe von Glycin, Purinen und Thymidin, um ihren Stoffwechsel aufrecht erhalten zu können<sup>4</sup>.

Stabil transfizierte Zelllinien werden mittels Kofransfektion von Zielgenen und DFHR-cDNA erhalten<sup>5</sup>. Die Amplifikation transfizierter Zellen erfolgt mit Hilfe des Tetrahydrofolat-Analogons Methotrexat (MTX, Amethopterin)<sup>6</sup>. Eine mit dieser Methodik etablierte CHO-Zelllinie, in welche die cDNA für Wildtyp-HCII integriert wurde, liegt in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Genetik“ vor<sup>7</sup>. Diese Wildtyp-HCII stabil exprimierende Zelllinie wurde unter anderem im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Des Weiteren wurde eine Methode zur Selektion transfizierter Zellen unter Verwendung des Aminoglykosids Geneticin (G418)<sup>8</sup> angewendet (siehe 3.3.5). Geneticin bindet spezifisch an den 80S Ribosomenkomplex und ist so ein effektiver Inhibitor der eukaryotischen Proteinsynthese<sup>9</sup>. Ihre Resistenz erhalten die Zellen durch Transfektion eines Resistenzgens, welches auf dem selben linearisierten Plasmid

---

<sup>1</sup> Kao & Puck, 1968

<sup>2</sup> Puck, 1958

<sup>3</sup> Alt *et al.*, 1978; Urlaub & Chasin, 1980

<sup>4</sup> Littlefield, 1964

<sup>5</sup> Subramani *et al.*, 1981

<sup>6</sup> Schimke, 1988; Ringold *et al.*, 1981; Kaufman & Sharp, 1982

<sup>7</sup> Böhme *et al.*, 2002

<sup>8</sup> Page & Sydenham, 1991

<sup>9</sup> Mingeot-Leclercq *et al.*, 1999; van Hove *et al.*, 1996

wie das Zielgen lokalisiert ist. Der in CHO-DUKX-B1-Zellen transfizierte Vektor (3.2.7) enthält das Neomycin-Resistenzgen. Neomycin und Geneticin sind Derivate des gleichen Aminoglykosids.

Bei der Darstellung einer stabil HCII exprimierenden CHO-Zelllinie und der Expression der unterschiedlichen HCII-Varianten wurden verschiedene Medien verwendet. Alle Medien basierten auf den Basalmedien Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (D-MEM) und Ham's F12. Sämtliche Medien enthielten Natriumhydrogencarbonat. Der pH-Wert wurde mit Hilfe einer kontrollierten CO<sub>2</sub>-Begasung über das Bicarbonatgleichgewicht eingestellt. Die verwendeten Medien wurden mit Milli-Q<sup>®</sup>-Reinstwasser angesetzt, durch einen 0,2 µm Einwegfilter (Sartolab P, Sartorius) sterilfiltriert und bei 4 °C gelagert. Supplemente des serumfreien Mediums sowie weitere Medienzusätze wurden sterilfiltriert (0,2 µm, Minisart<sup>®</sup> Plus, Sartorius) und die Stammlösungen bei –20 °C aufbewahrt.

Die Kultivierung der CHO-DUKX-B1-Zellen sowie die Selektion der transfizierten Kulturen erfolgte in einer 1:1 (w/w) Mischung aus D-MEM und Ham's F12 unter Zugabe von 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*, FCS, PAA Laboratories) sowie Antibiotika zur Vermeidung von mikrobiellen Infektionen. Das Selektionsmedium enthielt zusätzlich den Selektionsmarker Geneticin. Zur Kultivierung und Produktion der transfizierten Zellen war ein Medienwechsel erforderlich. Da die rekombinanten Proteine in ihrem oxidierten Zustand exprimiert werden sollten, musste ein oxidierendes Medium (D-MEM) verwendet werden.

**Tabelle 3.3-1:** Medien für die Kultivierung tierischer Zellen

<b>Transfektionsmedium</b>	
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F12, 1:1 Mixture) (GIBCO <sup>™</sup> , Life Technologies)	+ 0,215 g/L L-Glutamin + 2,6 g/L Glucose + 2,4 g/L NaHCO <sub>3</sub> Inkubation bei 5,5 % CO <sub>2</sub>
<b>Anzuchtmedium</b>	
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F12, 1:1 Mixture) (GIBCO <sup>™</sup> , Life Technologies)	+ 0,215 g/L L-Glutamin + 2,6 g/L Glucose + 2,4 g/L NaHCO <sub>3</sub> + Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x) + 10 % (v/v) FCS (PAA Laboratories) Inkubation bei 5,5 % CO <sub>2</sub>
<b>Selektionsmedium</b>	
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (D-MEM/F12, 1:1 Mixture) (GIBCO <sup>™</sup> , Life Technologies)	+ 0,215 g/L L-Glutamin + 2,6 g/L Glucose + 2,4 g/L NaHCO <sub>3</sub> + Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x) + 10 % (v/v) FCS (PAA Laboratories) + Geneticin-Lösung (50x) Inkubation bei 5,5 % CO <sub>2</sub>

**Tabelle 3.3-1:** Fortsetzung

Kultiviermedium transfizierter Zellen	
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium D-MEM, Low Glucose (GIBCO™, Life Technologies)	+ 0,468 g/L L-Glutamin + 3 g/L Glucose + 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> + Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x) + 10 % (v/v) FCS (PAA Laboratories) + Geneticin-Lösung (50x) Inkubation bei 8,5 % CO <sub>2</sub>
Produktionsmedium	
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium: D-MEM, Low Glucose (GIBCO™, Life Technologies)	+ 0,468 g/L L-Glutamin + 3 g/L Glucose + 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> + Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x) + Insulin-Transferrin-Selenium Supplement (100x) + Hypoxanthin/Thymidin/Prolin Supplement (100x) Inkubation bei 8,5 % CO <sub>2</sub>
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100x)	6,3 g/L Penicillin G (Biochrom AG) 10 g/L Streptomycinsulfat (Biochrom AG) in 10 mM Natriumcitrat, pH 7,4, sterilfiltriert
Hypoxanthin/Thymidin/Prolin Supplement (100x)	1,36 g/L (10 mM) Natriumhypoxanthin 0,386 g/L (1,6 mM) Thymidin 3,452 g/L (30 mM) L-Prolin in Milli-Q®-Wasser, pH 2, sterilfiltriert
Geneticin-Lösung (50x)	30 g/L Geneticinsulfat (PAA Laboratories) in 1 M HEPES, pH 7,4, sterilfiltriert
Insulin-Transferrin-Selenium Supplement (100x)	1 g/L Rinderinsulin (Sigma) 1 g/L Humantransferrin (Roche Diagnostics) 0,67 g/L Natriumselenit in Milli-Q®-Wasser, sterilfiltriert

### 3.3.2 Stammhaltung und Zellpassagierung

Anders als Bakterien sind viele Gewebezellen nicht an ein Wachstum in Suspension adaptiert und benötigen zum Wachsen und Teilen eine feste Oberfläche. Die Kultivierung der Zellkulturen wurde in Gewebekulturschalen und Gewebekulturflaschen mit Polystyroloberfläche (Nunclon, Nunc) vorgenommen. Zur Anzucht von CHO-BUKX-B1-Zellen und ihrer Transfektion wurden 8 cm<sup>2</sup>-Kulturschalen verwendet. Die Expansion der transfizierten Kulturen erfolgte über 25 und 75 cm<sup>2</sup>- auf schließlich 175 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen. Kultivierungen wurden in einem CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschrank (Forma Scientific Inc.) bei 37 °C und Wasserdampf gesättigter Atmosphäre vorgenommen. Die pH-Regulation erfolgte über CO<sub>2</sub>-Inkubation gemäß den eingesetzten Medien, wie unter 3.3.1 aufgeführt. Die Kulturflaschen verfügten über einen Membranfilter im Deckel um einen Gasaustausch zwischen Medienoberfläche und Inkubator zu gewährleisten.

Proliferierende Adhäsionskulturen wurden bis zum Zustand einer konfluenten Zellschicht (engl. *Layer*) kultiviert. Sie wurden für weitere Expansionen von der Oberfläche abgelöst und nachfolgend in neue Kulturbedingungen überführt. Der Passagierungsvorgang wurde mittels Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma) durchgeführt<sup>1</sup>. Zum Verdünnen einer adhären Kultur mit hoher Zelldichte wurde diese nach dem Waschen mit vorgewärmten PBS, mit 0,5-1 mL einer Trypsin-EDTA-Lösung versetzt und bei 37 °C für 5 Minuten inkubiert. Das Fortschreiten der Ablösung der Zellen von der Kunststoffoberfläche ließ sich mikroskopisch kontrollieren. Nach Ablösung der Zellen wurden diese mit FCS-haltigem Medium aufgenommen, in welchem das enthaltene FCS auch zur Inaktivierung von Trypsin diente. Eine Passagierung erfolgte in der Regel alle drei bis vier Tage mit einer Zellzahl von  $2-3 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$ .

### 3.3.3 Kryokonservierung und Trypanblau-Ausschlussfärbung

Von allen hergestellten HCII exprimierenden CHO-Varianten wurden sowohl Sicherungs- als Arbeitszellbanken angelegt und mittels Kryokonservierung gelagert. Kryokonservierung ermöglicht eine Langzeitlagerung von Zelllinien mit Hilfe starker Temperaturreduktion auf -180 °C. In diesem Zustand sind die Zellen bis zu mehreren Jahren lagerfähig. Die Konservierung wurde in einem Einfriermedium vorgenommen, welches aus dem normalen Kulturmedium unter Zugabe von 10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) besteht. Die im Einfriermedium enthaltenen kryoprotektiven Agenzien DMSO sowie FCS sollen die Bildung von zellschädigenden Flüssigkeitskristallen beim Einfriervorgang minimieren. Die Langzeitlagerung erfolgte in einem Kryotank (Biosafe, Messer-Griesheim) in der Dampfphase oberhalb flüssigem Stickstoffs (-196 °C). Zur Konservierung wurden die Zellen wie in 3.3.2 beschrieben mit Trypsin-EDTA suspendiert. Die Zellen wurden mit FCS-haltigem Medium aufgenommen und sedimentiert (800 rpm, Megafuge 1.0, Heraeus). Das Zellpellet wurde in Einfriermedium zu einer Zellkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen pro mL resuspendiert und in 1 mL Chargen der Kryokonservierung zugeführt. Bei Verwendung einer Kryokultur wurde die aufgetaute Zellsuspension in frischem Medium aufgenommen und das zelltoxische DMSO nach Zentrifugation entfernt.

Die Zellkulturen wurden routinemäßig hinsichtlich ihrer Zellzahl und Viabilität unter Verwendung der Trypanblau-Ausschlussfärbung kontrolliert. Die adhären Zellen wurden in PBS suspendiert (3.3.2) und mit Trypanblau-Lösung (0,4 %, Sigma) gleichen Volumens verdünnt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer<sup>1</sup>.

---

<sup>1</sup> Lindl & Bauer, 1994

### 3.3.4 Transfektion tierischer Zellen mittels Lipofektion

Transfektionen dienen der Untersuchung von Genregulation oder Genexpression und sind in der Lage die Charakteristika einer Zelle nachhaltig zu verändern. Allen Transfektionen liegt das Einbringen von DNA in die Zellen zugrunde. Dies wird unter anderem mit so unterschiedlichen Methoden wie Mikroinjektion<sup>1</sup>, viraler oder ballistischer<sup>2</sup> Transfektion erreicht. Auch elektrische Impulse (Elektroporation), die kurzzeitig die Zellmembran permeabel für die DNA machen, werden verwendet<sup>3</sup>. Die Einbringung von DNA auf chemischen Wege wird mittels Kalziumphosphatpräzipitation<sup>4</sup>, DEAE-Dextran-vermittelten Transfer<sup>5</sup> oder Liposomentransfer<sup>6</sup> ermöglicht. Die Liposomen-vermittelte Transfektion zeichnet sich besonders durch einfache Handhabung und Reproduzierbarkeit aus. Die verwendeten ionischen Lipide haben kaum einen Einfluss auf Zellwachstum oder Zellstoffwechsel, sind von den Zellen abbaubar und weder immunogen noch pathogen. Physikalische und chemische Eigenschaften der ionischen Lipide sind für ihre Transfektionseffizienz von Bedeutung. Ladungszahl<sup>7</sup> und Struktur des hydrophoben Anteils<sup>8</sup> üben dabei einen besonderen Einfluss aus. Als effektives Transfektionsreagenz hat sich ein Gemisch des kationischen Lipids DOSPA (2,3-dioleoyloxy-*N*-[2(spermincarboxamido)ethyl]-*N,N*-dimethyl-1-propanaminium trifluoroacetat) und des nichtionischen Lipids DOPE (Dioleoylphosphatidylethanolamin) erwiesen<sup>9</sup>, welches Bestandteil des in dieser Arbeit verwendeten Lipofectomin Plus<sup>TM</sup> Kits (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies) ist. Bei dem Plus-Reagenz handelt es sich um kationische Verbindungen, die eine Ladungsneutralisierung der DNA und dadurch eine kompaktere Form derselben ermöglichen sollen<sup>10</sup>.

Die Durchführung der Lipofektion erfolgte nach Vorgabe des Herstellers (Invitrogen<sup>TM</sup>, Life Technologies) in einer 8 cm<sup>2</sup> Gewebekulturschale. Dazu wurde eine proliferierende CHO-DUKX-B1-Zellkultur passagiert (3.3.2) und in einer Konzentration neu ausgesät, dass am Tag der Transfektion eine Zelllage mit einem Bedeckungsgrad von 70-80 % erreicht war. Das Medium wurde von der Kultur entfernt und die Zellen mit Transfektionsmedium (3.3.1) gewaschen. 100 µL Transfektionsmedium wurden mit 4 µL Lipofectamin<sup>TM</sup> für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel wurden 0,6-1,0 µg DNA in 100 µL Transfektionsmedium vorgelegt und 6 µL des Plus<sup>TM</sup> Reagenz zugefügt. Beide Ansätze wurden nach der Inkubationszeit vereinigt und für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der DNA-Liposomen-Komplex wurde gleichmäßig auf der mediumfreien

---

<sup>1</sup> Capecchi, 1980

<sup>2</sup> Ye *et al.*, 1990

<sup>3</sup> Neumann *et al.*, 1982

<sup>4</sup> Graham & van der Eb, 1973

<sup>5</sup> Vaheri & Pagano 1965

<sup>6</sup> Felgner *et al.*, 1987

<sup>7</sup> Wheeler *et al.*, 1996

<sup>8</sup> Solodin *et al.*, 1995

<sup>9</sup> Hodgson & Solaiman, 1996; Mizuarai *et al.*, 2001

<sup>10</sup> de Lima *et al.*, 1999

Zellkultur verteilt und nachfolgend 0,8 mL des Transfektionsmediums (Tabelle 3.3-1) zugefügt. Die Inkubation dieses Ansatzes im Begasungsbrutschrank bei 37 °C betrug 2 bis 3 Stunden. Im Anschluss daran wurden 2 mL des Anzuchtmediums zugegeben und die Zellen für 24 Stunden kultiviert. Danach folgte die Selektion und Expansion der transfizierten Zellen (3.3.5).

**Tabelle 3.3-2:** Arbeitsvorschrift für die Transfektion tierischer Zellen

Arbeitsschritte		
1. Zellen passagieren	Konfluenz am Tag der Transfektion 70-80 %	
2. Liposomenlösung	100 µl Medium mit 4 µL Lipofectamin™ versetzen	15 Minuten inkubieren, RT
3. DNA-Plus-Komplex	100 µl Medium mit 0,6-1 µg DNA und 6 µL Plus™ Reagenz versetzen	15 Minuten inkubieren, RT
4. DNA-Liposomen-Komplex	Mischen der Liposomenlösung mit DNA-Plus-Komplex	15 Minuten inkubieren, RT
5. Zellkultur waschen	Medium von Zellkultur entfernen und 2 x mit Transfektionsmedium waschen	
6. Transfektion	DNA-Liposomen-Komplex auf die Zellen geben und 0,8 mL Transfektionsmedium zufügen	2-3 Stunden bei 37 °C inkubieren
7. Kultivierung	2 mL Anzuchtmedium zugeben	24 Stunden bei 37 °C inkubieren

### 3.3.5 Darstellung stabil exprimierender CHO-Zelllinien

Die Darstellung der stabil exprimierender CHO-Zelllinien erfolgte aus einer CHO-DUKX-B1-Zelllinie und auf pcDNA3.1 basierenden Vektoren, welche eine für unterschiedliche HCII-Varianten kodierende cDNA enthielten. Insgesamt wurden sechs verschiedene Vektoren verwendet, die sich lediglich in der Version der eingefügten HCII-cDNA unterschieden (3.2.7). Die Genexpression erfolgt mit Hilfe des Promotors des menschlichen Cytomegalievirus (CMV)<sup>1</sup>. Dieser Kontrolle unterliegt auch das Neomycin-resistenzgen, das eine Selektion transfizierter Zellen ermöglicht. Der CMV-Promotor induziert auch die DNA-Replikation über den SV40-Replikationsstartpunkt<sup>2</sup>. Die aus Prokaryoten isolierten Plasmide (3.2.2.3) wurden über die singuläre *ScaI*-Schnittstelle linearisiert (3.2.4), um ein definiertes Spaltprodukt in das Genom der Zelle zu integrieren. Die Restriktionsspaltung wurde mittels Agarosegelelektrophorese kontrolliert. Auf diese Weise erhaltene DNA wurde gereinigt und konzentriert (3.2.2.5 & 3.2.2.6). Mit Hilfe der ethanolischen Fällung sollte auch die Sterilität der DNA gewährleistet werden. Die DNA wurde in PBS gelöst und ihre Konzentration photometrisch (3.2.3) bestimmt. Die linearisierte DNA diente der Transfektion von CHO-DUKX-B1-Zellen mittels Lipofektion wie unter 3.3.4 beschrieben.

<sup>1</sup> Foecking & Hofstetter, 1986; Boshart *et al.*, 1985

<sup>2</sup> Pari & St Jeor, 1990

Im Anschluss an die Transfektion wurden die Zellen für 24 Stunden in Anzuchtmedium kultiviert. Danach folgte ein Medienwechsel unter Einsatz von Selektionsmedium (3.3.1). Die Selektionsphase variierte bei den unterschiedlichen CHO-Zelllinien zwischen 2-3 Wochen. Parallel zur Selektion der transfizierten Zellen wurden auch nicht transfizierte CHO-DUKX-B1-Zellen mit Selektionsmedium kultiviert, um die spezifische Wirkung des Geneticins zu kontrollieren. Die Konzentration des Geneticins im Medium, die eine effektive Selektion der Zellen bewirkt, ist von vielen Faktoren abhängig, zu denen auch der Zelltyp zählt. Die wirksame Geneticinkonzentration variiert bei bekannten Zelltypen zwischen 100 und 1000  $\mu\text{g/mL}$ <sup>1</sup>. Frühere Ergebnisse haben ergeben, dass eine Konzentration von 600  $\mu\text{g/mL}$  Geneticin ausreichend ist, um nicht resistente CHO-Zellen in einem Zeitraum von einer Woche abzutöten<sup>2</sup>. Nach der Selektionsphase wurden die verbleibenden Zellen einer jeweiligen CHO-Transfektion zusammengeführt. Der Pool dieser Zellen wurde dann weiter kultiviert und expandiert. Im engeren Sinne handelt es sich bei den verwendeten Zellen also nicht um Zelllinien, da sie aus einem Pool aus transfizierten Zellen und nicht aus einer einzelnen Zelle stammen. In dieser Arbeit wird aber zur Vereinfachung der Begriff Zelllinie für den selektierten Zellpool verwendet. Insgesamt wurden mit der beschriebene Methode sechs verschiedene HCII-Varianten exprimierende CHO-Zelllinien generiert. Die Zellen wurden in 175  $\text{cm}^2$  Gewebekulturflaschen expandiert, bis ein Bedeckungsgrad von etwa 80-90 % erreicht war. Das Kulturmedium wurde abgenommen und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen um Serumreste von den Zellen zu entfernen. Die Produktion von rekombinantem HCII erfolgte in 80 mL Produktionsmedium (3.3.1) für vier bis maximal fünf Tage. Nach der Produktionsphase wurde das Medium entnommen und Zellen sowie Zelltrümmer durch Zentrifugation bei 4 °C entfernt (4200 x g, Cryofuge 6000, Haeraus Sepatech). Der Überstand wurde mit 1 g/L PEG-8000 sowie PMSF (Endkonzentration 1 mM) versetzt und bei -20 °C gelagert.

---

<sup>1</sup> Strutzenberger *et al.*, 1999; Hubbard *et al.*, 1994

<sup>2</sup> Binkmeyer, 2001

## 3.4 Proteinchemische Methoden

### 3.4.1 Protein-Quantifizierung

#### 3.4.1.1 ELISA

Ein ELISA (eng. *enzyme linked immunosorbent assay*) ist eine einfache und schnelle Methode zur Detektion von Mikromengen eines Proteins in Lösungsgemischen, die die spezifische Bindung zwischen Antikörpern und Antigenen nutzt<sup>1</sup>. Die *Sandwich*- oder Doppelantikörpertechnik ist eine Festphasenmethode mit hoher Selektivität. Ein erster Antikörper (Fangantikörper) wird an eine Polystyrol-Mikrotiterplatte immobilisiert und verbleibende Proteinbindungsstellen auf der Oberfläche durch BSA-Lösung abgesättigt. Das Antigen wird an den immobilisierten Antikörper gebunden und mittels eines enzymgekoppelten zweiten Antikörpers (Detektionsantikörper) nachgewiesen, der gegen ein weiteres Epitop des Antigens gerichtet ist. Bei Zugabe einer geeigneten chromogenen Substratlösung kommt es dann mit Hilfe des Enzymkonjugats des zweiten Antikörpers zu einer Farbreaktion. Diese ist direkt proportional zur Menge des Antigen-Antikörper-Komplexes und lässt somit eine Schlussfolgerung auf die Konzentration der zugefügten Antigenlösung zu.

**Tabelle 3.4-1:** HCII-ELISA

Antikörper 1: Fangantikörper	monoklonaler Maus-IgG 2b, 188/2/1, (Hoechst), 1,79 mg/mL in PBS, -80 °C
Antikörper 2: Detektionsantikörper	monoklonaler Maus-IgG 1 92/2/12, HRP-Konjugat (Hoechst), 1 mg/mL in 50 mM Tris-HCl-Puffer, -80 °C
MSTB-Puffer	0,2 % (v/v) Triton X-100 (Serva) 0,2 % (w/v) SDS 2,5 % (w/v) BSA (Serva) 0,1 M MOPS pH 7,4
Waschpuffer	10 mM Phosphatpuffer 75 mM NaCl 0,05 % (v/v) Tween 20 pH 7,4
Beschichtungslösung	100 µL Fangantikörper, 1:100 in PBS
Blockierungslösung	200 µL, 0,2 g BSA (Serva) in 20 mL Waschpuffer
Probenverdünnung	Proben in MSTB-Puffer verdünnt 25 IE/mL Heparin (Sigma, H-3393)
Konjugatlösung	100 µL Detektionsantikörper, 1:1000 in PBS/10 % FCS (v/v)
Substratlösung	<i>TMB Microwell Peroxidase System</i>
Stopplösung	150 µL, 0,5 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

<sup>1</sup> Ngo, 1991; Engvall & Perlmann, 1972

In dieser Arbeit wurde ein *Sandwich*-ELISA zur Konzentrationsbestimmung von HCII in Lösung verwendet. Zwei monoklonale Maus-Antikörper wurden dazu eingesetzt, wobei der Detektionsantikörper eine konjugierte Meerrettich-Peroxidase (engl. *horse radish peroxidase*, HRP) enthielt. Die Detektionsreaktion erfolgte über Oxidation von Tetramethylbenzidin (TMB), durch das *TMB Microwell Peroxidase System* (Kirkegaard & Perry, Dunn). Zur Standardisierung der HCII-Konzentrationsbestimmung diente Human-Plasma (ORKL12) der Firma Behring mit 90 µg/mL HCII<sup>1</sup>. Der verwendete ELISA wurde entsprechend bekannten Vorschriften<sup>2</sup> in Mikrotiterplatten (Maxisorb F96, Nunc) durchgeführt. Die HCII-Detektion erfolgte mittels Extinktionsmessung des Tetramethyl-diphenochinon-diimoniums bei 405 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm in einem Microplate-Reader (ELx808 Microplate Autoreader, Bio-Tek Instruments Inc.) durch das Analyseprogramm Mikro-Win (Version 3.15, Mikrotek Laborsysteme GmbH).

### 3.4.1.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen bei 280 nm Wellenlänge, beruht auf einem Verfahren von Gill und von Hippel<sup>3</sup>. Als Grundlage dient eine UV-Spektrometrie auf der mathematischen Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes. Dieses macht die Kenntnis des molaren Extinktionskoeffizienten für das zu untersuchende native Protein notwendig. Extinktionskoeffizienten lassen sich nur für denaturierte Proteine experimentell ermitteln. Bei 280 nm Wellenlänge haben lediglich die aromatischen Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan sowie Cystein einen Einfluss auf die Lichtabsorption ( $\Delta A$ ). Bei bekannter Aminosäuresequenz eines denaturierten Proteins ergibt sich der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon_{\text{denat}}$ ) aus der Summe der Extinktionskoeffizienten dieser drei Aminosäuren.

$$\epsilon_{\text{Protein, denat}} = n_{\text{Tyr}} * \epsilon_{\text{Tyr}} + n_{\text{Trp}} * \epsilon_{\text{Trp}} + n_{\text{Cys}} * \epsilon_{\text{Cys}} \quad (1)$$

Mit einem Fehler von 3-4 % kann dieser Extinktionskoeffizient für denaturierte Proteine auch auf native Proteine angewendet werden<sup>4</sup>.

$$c_{\text{nativ}} = \Delta A_{\text{nativ}} / \epsilon_{\text{Protein, denat}} \quad (2)$$

In dieser Arbeit erfolgten photometrische Konzentrationsbestimmungen gereinigter Proteine in einem UV/VIS-Spektrophotometer (UV-1602, Shimadzu) bei 280 nm gegen das Lösungsmittel als Referenz. Der für die HCII-Varianten mit unterschiedlicher Aminosäure-

<sup>1</sup> Tollefsen *et al.*, 1982

<sup>2</sup> Hölper, 1991; Böhme, 2001; Brinkmeyer, 2001

<sup>3</sup> Gill & von Hippel, 1989; Pace *et al.*, 1995

<sup>4</sup> Edelhoch, 1967

sequenz verwendete molare Extinktionskoeffizient wurde mit Hilfe des *Peptide Property Calculator* (Version 1.0, *Center for Biotechnology*, Northwestern University, IL), basierend auf der zuvor beschriebenen Grundlage, berechnet.

### 3.4.2 Elektrophoretische Verfahren

#### 3.4.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Elektrophoretische Methoden nutzen die Mobilität von geladenen Teilchen im elektrischen Feld aus. Unterschiede in Größe und Ladungszustand verschiedener Teilchen verursachen eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit und bewirken ein hohes Auflösungsvermögen, das elektrophoretische Verfahren zu wertvollen Methoden bei analytischen und präparativen Trennproblemen macht. Proteine bewegen sich in einem elektrischen Feld in Abhängigkeit von ihrer Nettoladung, ihrer Größe und Gestalt. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese verwendet eine inerte Matrix aus vernetzten Polyacrylamid, dessen Porengröße mittels Variation der Acrylamidkonzentration gesteuert werden kann. Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) befinden sich die Proteine in einem Medium, welches das negativ geladene Detergens Natriumdodecylsulfat (engl. *sodium dodecyl sulphate*, SDS) enthält. SDS lagert sich in einem konstanten Verhältnis von 1,4 g SDS pro g Protein an die Polypeptidketten an<sup>1</sup>. Die Proteine werden durch diesen Vorgang gestreckt und entfaltet und nehmen dadurch eine einheitliche Gestalt an. Da sich alle Peptide mit einem konstanten Verhältnis an SDS-Molekülen umgeben, erfolgt die Auftrennung der Proteine ausschließlich nach ihrer Größe. Anormalitäten im Laufverhalten zeigen denaturierte Proteine mit posttranslationalen Modifikationen, wie Glykosylierungen. Die Kohlenhydrate beladen sich nicht mit SDS und unterstützen somit nicht die Wanderung des Proteins im elektrischen Feld. Auch vorhandene intramolekulare Disulfidbrücken im Protein haben einen Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit. Daraus resultiert eine unterschiedliche Mobilität von Proteinen im reduzierten oder oxidierten Zustand.

Die durchgeführten Elektrophoresen erfolgten in Anlehnung an bekannte Methoden<sup>2</sup>. Verwendet wurden zwei unterschiedliche Gelsysteme aus 10 %igen Acrylamid-Fertiggelen der Firma Invitrogen. Je nach Anwendung wurden Novex<sup>®</sup> Tris/Glycin oder NuPAGE<sup>®</sup> Novex<sup>®</sup> Bis-Tris Gele verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers<sup>3</sup> in entsprechenden Elektrophoresesystemen (Xcell II<sup>™</sup>, Mini Cell, Invitrogen) bei konstanter Spannung (150 bzw. 200 Volt). Die Dauer der Elektrophorese variierte in Abhängigkeit vom verwendeten System und der zu erzielenden Trennleistung.

---

<sup>1</sup> Weber & Osborn, 1969; Lottspeich & Zorbas, 1998

<sup>2</sup> Laemmli, 1970; Swank & Munkres, 1971

<sup>3</sup> Novex Pre-Cast Gel Elektrophoresis Guide, Invitrogen, 2003

**Tabelle 3.4-2:** SDS-Gelelektrophorese

Elektrophoresepuffer Novex <sup>®</sup> Tris/Glycin	192 mM Glycin p.a. (Baker, NL) 25 mM Tris-HCl (Sigma) 0,1 % (w/v) SDS 150 Volt
Probenpuffer Novex <sup>®</sup> Tris/Glycin (2X)	3,8 mL Milli-Q <sup>®</sup> -Wasser 1,6 mL 10 % (w/v) SDS-Lösung 1,0 mL 0.5 M Tris-HCl (Sigma), pH 6.8 0,8 mL Glycerin 0,4 mL Bromphenolblaulösung (0,05 % w/v)
Reduzierend	zufügen von 0,4 mL $\beta$ -Mercaptoethanol
Elektrophoresepuffer NuPAGE <sup>®</sup> Novex <sup>®</sup> Bis-Tris	NuPAGE <sup>®</sup> MOPS SDS Running Buffer 200 Volt
Probenpuffer NuPAGE <sup>®</sup> Novex <sup>®</sup> Bis-Tris (4X)	NuPAGE <sup>®</sup> LDS Sample Buffer
Reduzierend (10X)	ad. NuPAGE <sup>®</sup> Sample Reducing Agent
Elektrophoresekammer	XCell II <sup>™</sup> , Mini Cell, Invitrogen
Netzgerät	Electrophoresis Power Supply PS 3002 (Gibco)
Markerproteine (Novex <sup>®</sup> Tris/Glycin System)	<i>low molecular weight marker</i> , LMW (Pharmacia) Phosphorylase B (94 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa), $\alpha$ -Lactalbumin (14,4 kDa)  <i>MagicMark<sup>™</sup> Protein Standard</i> , (Invitrogen) rekombinante, IgG-bindende Proteine (120, 100, 80, 60, 40, 30, 20 kDa)  <i>BenchMark<sup>™</sup> Pre-Stained Protein Ladder</i> (Invitrogen) (181,8, 115,5, 82,2, 64,2, 48,8, 37,1, 25,9, 19,4, 14,8, 6,0 kDa)
Markerproteine (NuPAGE <sup>®</sup> Bis-Tris System)	<i>MultiMark<sup>®</sup> Multi-Colored Standard</i> (Invitrogen) Myosin (188 kDa), Phosphorylase B (97 kDa), Glutamatdehydrogenase (52 kDa), Carboanhydrase (33 kDa), Myoglobin (21 kDa), Lysozym (12 kDa)

### 3.4.2.2 Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Die Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung beruht auf einer Reaktion des Farbreagens mit den Aminogruppen der Lysin-Seitenketten und den freien N-Termini der Proteine. In alkoholischer Lösung lagert sich der Farbstoff an die denaturierten Proteine an <sup>1</sup>.

Die Polyacrylamid-Gele bzw. die proteintragenden PVDF-Membranen wurden in der Färbelösung 20 Minuten im Wasserbadschüttler bei 50 °C gefärbt. Die Hintergrundfärbung wurde mit Entfärber-Lösung und demineralisiertem Wasser entfernt. Zur Aufbewahrung wurden die Polyacrylamid-Gele bei 65 °C im Vakuum (Geltrockner 583, Bio-Rad Laboratories) getrocknet.

**Tabelle 3.4-3:** Bedingungen der Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung

Färbelösung	1 Coomassie R-350 Tablette (Pharmacia) 150 mL Milli-Q <sup>®</sup> -Wasser 100 mL Isopropanol p.a. 50 mL Essigsäure p.a.
Entfärber	700 mL Milli-Q <sup>®</sup> -Wasser 200 mL Isopropanol p.a. 100 mL Essigsäure p.a.

### 3.4.3 Western-Blot

Zur Analyse der elektrophoretisch (3.4.2.1) getrennten Proteine ist häufig eine Isolierung aus der Polyacrylamid-Gelmatrix notwendig. Die Proteine werden dazu auf eine Membran übertragen und auf dieser detektiert. In seiner Gesamtheit wird dieser Prozess aus SDS-PAGE, Blotting und Detektion häufig als Western-Blot bezeichnet <sup>2</sup>. Unter Verwendung des ElektrobloTTings werden die zuvor aufgetrennten Proteine immobilisiert, indem sie über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran transferiert werden <sup>3</sup>. Die durch die SDS-PAGE erreichte Lokalisation der Proteine bleibt dabei konserviert. Der Transfer erfolgt mittels der aus der Elektrophorese an die Proteine gebundenen, negativ geladenen Dodecylsulfatanionen, welche mit fortschreitender Transferzeit von den Proteinen getrennt werden. Dieser Vorgang begünstigt die Adhäsion der Proteine an die hydrophobe Membranoberfläche.

<sup>1</sup> Schägger *et al.*, 1988

<sup>2</sup> Towbin *et al.*, 1979

<sup>3</sup> Burnette, 1981

### 3.4.3.1 Elektrotransfer

Der Elektrotransfer der Proteine wurde mittels der *Semi-Wet*-Methode in XCell II™ Blot-Modulen (Invitrogen) vorgenommen<sup>1</sup>. Verwendet wurden PVDF-Membranen (Polyvinylidendifluorid), die zuvor durch Methanol hydrophilisiert und dann in Transferpuffer 10 Minuten inkubiert wurden. Die so behandelte Membran wurde danach blasenfrei mit dem Elektrophoresegel in Kontakt gebracht. Zu beiden Seiten dieser Anordnung wurde je ein, in Transferpuffer äquilibriertes Blotpapier und zwei Blottingpads angelegt. Dieses *Sandwich* wurde in die Blotkassette, mit Ausrichtung des Gels zur Kathode gelegt und danach senkrecht in der Blotkammer eingespannt. Die Blotkassette wurde mit Transferpuffer gefüllt und die sie umgebende Kammer zur Wärmeableitung mit Milli-Q®-Wasser umspült. In Abhängigkeit des verwendeten Acrylamidgels (Novex® Tris/Glycin bzw. NuPAGE® Bis-Tris) wurden verschiedene Transferpuffer verwendet.

**Tabelle 3.4-4:** Bedingungen des Elektrotransfers

Transferpuffer (Novex® Tris/Glycin System)	96 mM Glycin 12 mM Tris 20 % (v/v) Methanol
Transferpuffer (NuPAGE® Bis-Tris System)	NuPAGE® Transfer Buffer (Invitrogen)
Blotmembran	Hybond™-P (Amersham Biosciences)
Transferbedingungen	Blotpapier 1,2 mm (Schleicher & Schüll) XCell II™ Blot Modul (Invitrogen) Netzgerät 200/2.0 (Bio-Rad Laboratories) 25 V; 90 Minuten; 25 °C

### 3.4.3.2 Immunologische Detektion

Immunologische Detektionen eignen sich um Antigene durch Antikörper mit gekoppelter enzymatischer Funktion nachzuweisen. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um HCII oder  $\alpha$ -Thrombin zu erfassen. Dazu wurde ein System eines Kaninchen IgG-Antikörpers aus Serum in Kombination mit einem zweiten, Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet. Der sekundäre Antikörper enthielt eine konjugierte Peroxidasefunktionalität (HRP), durch welche eine Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes in einer Chemilumineszenzreaktion möglich war.

Die im Elektrotransfer verwendete Membran (3.4.3.1) wurde zunächst in einer BSA enthaltenen Blockierlösung abgesättigt. Wahlweise wurde dies für 14 Stunden bei 4 °C oder für 1 Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Danach wurde die Membran dreimal 10 Minuten mit der Waschlösung behandelt und dann eine Stunde in der Antikörperlösung inkubiert. Durch erneutes Waschen wurde ungebundener Antikörper entfernt und die Membran in der Konjugatlösung für eine Stunde inkubiert. Nach einem weiteren

<sup>1</sup> Novex Pre-Cast Gel Elektrophoresis Guide, Invitrogen, 2003

Waschvorgang (s.o.) konnte die behandelte Membran mittels eines Chemilumineszenzverfahrens analysiert werden. Verwendet wurde das ECL™ (engl. *enhanced chemiluminescence*) Western-Blotting-System (Amersham Biosciences) in Kombination mit geeigneten Radiographiefilmen (Hyperfilm™ ECL™, Amersham Biosciences). Die Belichtung der Radiographiefilme wurde in Autoradiographiekassetten mit Belichtungszeiten zwischen 15 Sekunden und 20 Minuten vorgenommen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers<sup>1</sup>.

**Tabelle 3.4-5:** Immunologische Detektion im Western-Blot

PBS-Tween	PBS 0,3 % (v/v) Tween-20 (Serva)
Blockierungslösung	PBS-Tween 3 % BSA (Serva)
Antikörperlösung	Anti-human-HCII Kaninchenantiserum (Hoechst, Serum Kan1, Abnahme 7, 02.01.1989), 1:20000 verdünnt in PBS-Tween, 1 % BSA (Serva) Anti-human-Thrombin Kaninchenantiserum (Hoechst, Ch.-B.: 62HR/08) 1:20000 verdünnt in PBS-Tween, 1 % BSA (Serva)
Konjugatlösung	PBS-Tween 1% BSA (Serva) Anti-Kaninchen Eselantikörper, IgG Peroxidase-gekoppelt (Amersham Biosciences, NA 934), 1:2000 verdünnt
Detektion	Hyperfilm™ ECL™ (RPN 3103, Amersham Biosciences) ECL™ Western Blotting Detection Reagents (RPN 2106, Amersham Biosciences) Fixierer Unifix (Kodak) Entwickler D-19 (Kodak)

### 3.4.4 Alkylierung von rekombinantem HCII

Um Charakteristika der disulfidverbrückten HCII-Varianten näher zu untersuchen, wurden die rekombinanten Proteine auch in ihrem reduzierten Zustand untersucht. Dazu wurden die HCII-Varianten reduziert und nachfolgend die Cysteine alkyliert um Reoxidationen zu verhindern. Verwendet wurden gereinigte HCII-Varianten (3.8), deren Aktivitäten durch  $\alpha$ -Thrombin-Komplexierung zu bestimmen waren (3.9.6.1). Die Reduktion erfolgte mit Dithiothreitol (DTT) unter milden basischen Bedingungen in Analogie zu beschriebenen

<sup>1</sup> Efficient Detection of Biomolecules by Autoradiography, Fluorography or Chemiluminescence, Amersham Biosciences, 2003<sup>a</sup>

Methoden<sup>1</sup>. Die freien Cysteine wurden mit Iodacetamid zu S-Carboxamidomethylcystein derivatisiert<sup>2</sup>.

**Tabelle 3.4-6:** Alkylierungsbedingungen von rekombinanten HCII-Varianten

rek. HCII-Varianten (siehe 3.8)	100-600 $\mu$ L 250 nM – 2,5 $\mu$ M
Reduktionslösung	100 mM Dithiothreitol (DTT) 0,5 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8,0 60 Minuten, 25 °C
Alkylierungslösung	150 mM Iodacetamid 0,5 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8,0 30 Minuten, RT
Dialyse	Slide-A-Lyzer <sup>®</sup> Mini Dialysis Units (Pierce) MWCO 10 kDa 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % (w/v) PEG 8000, pH 7,4

Lösungen von affinitätsgereinigten HCII-Varianten wurden mit 1/20 Volumen einer Reduktionslösung (100 mM DTT in 0,5 M Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 8,0) versetzt und für 1 Stunde bei 25 °C inkubiert. Nachfolgend wurden der Lösung 1/10 Volumen der Alkylierungslösung zugesetzt und das Gemisch für 30 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Das Alkylierungsreagenz wurde in einer Menge zugeführt, die ausreichte um Cysteine wie auch restliches Reduktionsmittel zu alkylieren. Im Anschluss der Alkylierung wurde die Reaktionslösung dialysiert um DTT, Iodacetamid sowie deren Produkte zu entfernen.

### 3.4.5 Reduktion und Reoxidation von rekombinantem HCII

Die Einführung einer Disulfidbrücke bei den HCII-Varianten rHCII  $\Delta$ C/F195C/P52C, rHCII  $\Delta$ C7F195C/G54C und rHCII  $\Delta$ C7F195C/S68C wurde durch Reduktion und Reoxidation der Proteine verifiziert. Der Nachweis einer Reoxidation *in vitro* sollte zusätzlich als Argument dienen, die korrekte Faltung und Konformation der rekombinanten HCII-Varianten auch in ihrem oxidierten Zustand zu belegen. Als HCII-haltige Proben dienten serumfreie Medienüberstände transfizierter CHO-DUKX-B1-Zellen (3.3.5). Als Reduktionsmittel wurde 1/100 Volumen Dithiothreitol (DTT, 200 mM) zugefügt. Dann wurde 1 Stunde bei RT inkubiert und nachfolgend dialysiert. Die Reoxidation erfolgte mit 1/10 Volumen Kupfer(II)-Phenanthrolinlösung<sup>3</sup> oder mit einem 1/100 Volumen eines Gemisches aus

<sup>1</sup> Church *et al.*, 1987; Longas *et al.*, 1980

<sup>2</sup> Darby & Creighton, 1997

<sup>3</sup> Zeng *et al.*, 1999

reduzierten und oxidierten Glutathion im Verhältnis 1:1<sup>1</sup>. Die Proben wurden nach Reoxidation im Western-Blot (3.4.3) analysiert.

**Tabelle 3.4-7:** Reoxidationsbedingungen von rekombinanten HCII-Varianten

rekombinante HCII-Varianten in Zellkulturüberständen	rHCII $\Delta$ C/F195C/P52C rHCII $\Delta$ C/F195C/G54C rHCII $\Delta$ C/F195C/S68C
Reduktionslösung	200 mM Dithiothreitol (DTT) 60 Minuten, RT
Dialyse	Slide-A-Lyzer <sup>®</sup> Dialysis Cassettes (Pierce) MWCO 10 kDa 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8,0 3-6 Stunden bei 4 °C
10-fach Kupfer(II)-Phenanthrolin Oxidationslösung	500 $\mu$ M Kupfer(II)(1,10-Phenanthrolin)dichlorid 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 16 Stunden, 4 °C
100-fach Glutathion Oxidationslösung (GSH) <sup>2</sup> /GSSG Verhältnis 1:1	200 mM reduziertes Glutathion (GSH) 100 mM oxidiertes Glutathion (GSSG) 0,5 M Tris-HCl, pH 8,0 16 Stunden, RT

### 3.4.6 Behandlung von Dermatansulfat mit Natriumnitrit

Um den Einfluss von Dermatansulfat auf die HCII-Aktivität zu ermitteln, musste das Dermatansulfat zuvor chemisch behandelt werden. Kommerzielle Dermatansulfatpräparationen enthalten immer Verunreinigungen mit Heparin, welches durch Deaminierung inaktiviert werden kann<sup>2</sup>. Nach Dialyse wurde das behandelte Dermatansulfat in kinetischen Reaktionen eingesetzt.

**Tabelle 3.4-8:** Bedingungen der Natriumnitritbehandlung von Dermatansulfat

Dermatansulfat	3000 $\mu$ g/mL in Deaminierungslösung
Deaminierungslösung (frisch angesetzt)	240 mM Natriumnitrit 10 %ige Essigsäure (1,8 M) 0,1 % PEG 8000
Deaminierung	2 Stunden, RT im Dunkeln
Dialyse	Slide-A-Lyzer <sup>®</sup> Dialysis Cassettes (Pierce) MWCO 3,5 kDa 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % PEG 8000, pH 7,4 6 Stunden bei 4 °C

<sup>1</sup> Wen *et al.*, 1996; Wetlaufer *et al.*, 1987; Winter *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Nakheleh *et al.*, 1988; Tollefsen *et al.*, 1983; Teien *et al.*, 1976

## 3.5 Chromatographie

Bei der Chromatographie handelt es sich um eine Methodik zur Trennung eines Stoffgemisches in seine Komponenten durch Aufteilung zwischen zwei Phasen, wobei die mobile Phase, mit Gelegenheit zum Stoffaustausch, an der stationären Phase vorbeigeführt wird. Es lassen sich dadurch häufig hohe Trennleistungen erzielen, wobei im allgemeinen nur geringe Mengen des aufzutrennenden Komponentengemisches eingesetzt zu werden brauchen<sup>1</sup>. Neben der Ausschlusschromatographie (Gelfiltration), die gelöste Moleküle nach ihrer Größe trennt, gibt es noch weitere Methoden, die sich spezifische Eigenschaften der zu trennenden Komponenten zunutze machen. Die größte Bedeutung kommt dabei der Trennsäule mit ihrer stationären Phase zu. Deren Trägermaterial kann aus Biopolymeren, synthetischen oder anorganischen Polymeren bestehen. An diese sind funktionelle Gruppen meist kovalent gebunden, die die Art der chromatographischen Trennmethode festlegen. So kann man z.B. zwischen Hydrophobizitäts-, Ionenaustausch-, Umkehrphasen- oder Affinitätschromatographie unterscheiden.

### 3.5.1 Fast-Performance-Liquid-Chromatographie

In dieser Arbeit wurden chromatographische Methoden zu unterschiedlichen Zwecken angewendet. Diese umfassten sowohl präparative (3.6, 3.7.1), wie auch analytische Vorhaben (3.9.2, 3.9.3). Die verwendeten chromatographischen Systeme basierten auf Affinitätschromatographien und Ionentauschchromatographien. Alle diese Methoden wurden mit Hilfe eines FPLC<sup>®</sup>-Systems (engl. *fast performance liquid chromatography*) durchgeführt. Das verwendete FPLC<sup>®</sup>-System von Pharmacia bestand aus zwei Kolbenpumpen (P-500), einer Kontrolleinheit (LCC-501 Plus), einem Leitfähigkeitsmonitor, einer UV-Detektionseinheit (UV-1, 280 nm Wellenlänge), einer Mischzelle, drei Motorventilen (MV7, 2 x MV8), einem Fraktionssammler (FRAC-100) sowie einem Zweikanalschreiber (REC 102). Die Steuerung des FPLC<sup>®</sup>-Systems erfolgte entweder manuell über die LCC-501 Kontrolleinheit oder über einen angeschlossenen Leitreechner mit der Steuerungssoftware FPLC<sup>®</sup>-Director (Version 1.10, Pharmacia), mit deren Hilfe beliebige chromatographische Abläufe programmiert werden konnten, sowie die Ergebnisse in Form von Chromatogrammen aufgezeichnet werden konnten. Das FPLC<sup>®</sup>-System ist für die Aufarbeitung von biologischen Materialien im Mikrogramm- bis Milligramm-Maßstab geeignet. Die Kolbenpumpen sind zur Erzeugung eines Gradienten geeignet und können mit Fließgeschwindigkeiten zwischen 0,2 mL/min und 10 mL/min betrieben werden.

Die verwendeten Medien und Proteinlösungen mussten vor Verwendung partikelfrei sein. Dies wurde mittels Zentrifugation (10.000 x g, 10 Minuten) oder durch Filtration (Bottle-Top Vakuumfiltrationseinheit MF75<sup>™</sup>, 0,45 µm, Nalgene<sup>®</sup>, Nunc) erreicht. Die Probenapplikation

---

<sup>1</sup> Doerffel & Geyer, 1971

wurde über eine Injektionsschleife am Motorventil MV7 vorgenommen. Bei großvolumigen Proben fand die Beladung alternativ über eine der Systempumpen statt. Die eingesetzten Puffer wurden mit Hilfe von Ultraschall oder im Wasserstrahlvakuum entgast. Die Säulenmatrices wurden nach Verwendung, zur Verhinderung von mikrobiellen Infektionen in präservativen Puffern gelagert (20 % (v/v) Ethanol p.a. oder 0,02 %  $\text{NaN}_3$ ). Alle Säulenmatrices und alle weiteren Medien wurden bei 4 °C aufbewahrt. Zu Beginn einer Chromatographie (Affinitäts- oder Ionenaustauschchromatographie) wurden die Matrices mit dem Laufpuffer (allg. Puffer A) äquilibriert und nachfolgend mit der jeweiligen Produktlösung (Proteinlösung oder Kulturüberstand) beladen. Die Auswaschung ungebundener Substanzen erfolgte mit demselben Puffer wie zuvor die Äquilibrierung. Die Entfernung der ungebundenen Substanzen von der Säulenmatrix konnte in den meisten Fällen durch Beobachtung des UV-Signals bis zum Erreichen der Basislinie verfolgt werden. Die Elution wurde durch Wechsel zum Elutionspuffer (allg. Puffer B) eingeleitet. Dabei wurde je nach Methode die Elution in einer Stufe oder durch einen linearen Gradienten von Laufpuffer zu Elutionspuffer initiiert.

### 3.5.1.1 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie macht sich biologische Bindungswechselwirkungen auf Proteinoberflächen zunutze. Der Adsorbent wird dabei spezifisch und reversibel an die matrixverknüpften funktionellen Gruppen gebunden und so von den anderen Bestandteilen des Komponentengemisches getrennt. Die Affinitätschromatographie basiert auf biologischen Interaktionen wie Enzym/Substrat-, Antigen/Antikörper-, Metallionen/Protein- oder Hormon-Rezeptor-Wechselwirkungen. Es wird dabei zwischen gruppenspezifischen und monospezifischen Liganden unterschieden, die entweder eine ganze Molekülklasse oder eine bestimmte Substanz selektiv binden. Monospezifische Bindungen nutzen die hohe Selektivität zwischen Ligand und Adsorbent aus, wie sie z.B. zwischen Antigen/Antikörper oder Enzym/Substrat besteht. Bei allen Affinitätschromatographien wird der Adsorbent in nahezu reiner Form eluiert. Dies wird durch kompetitive Verdrängung, mittels Konformationsänderung als Folge einer pH-Wert-Änderung, durch Polarisationsänderung und chaotrope Eluate oder mittels wechselnder Ionenstärke erreicht. In dieser Arbeit wurden Methoden verwendet, die den Gruppen der Protein/Kofaktor-, Immunoaffinitätschromatographie oder Metallionenaffinitätschromatographie (IMAC, engl. *immobilized metal affinity chromatography*) zuzuordnen sind. Die verwendeten Affinitätsmatrices sind in der folgenden Tabelle 3.5-1) aufgeführt.

**Tabelle 3.5-1:** Charakteristika der verwendeten Affinitätsmatrices

HiTrap™ Heparin HP Sepharose™ (Amersham Biosciences)	Matrix	quervernetzte Agarose, 6 %
	Partikel-Größe	34 µm
	Ligand	Heparin, mucosa ( <i>porcine</i> ), 10 mg Heparin/mL
	Kopplungsart	N-Hydroxysuccinimid-vernetzter Ligand
	Ausschlussvolumen	4 x 10 <sup>6</sup> Da
	Bindungskapazität	3 mg ATIII( <i>bovine</i> )/mL
	Gelbettvolumen	1 mL
HiTrap™ Chelating HP Sepharose™ (Amersham Biosciences)	Matrix	quervernetzte Agarose, 6 %
	Partikel-Größe	34 µm
	Ligand	Iminodiacetat
	Kopplungsart	Ether-vernetzter Ligand
	Ausschlussvolumen	4 x 10 <sup>6</sup> Da
	Metallionenkapazität	≈ 23 µmol Cu <sup>2+</sup> /mL
	Bindungskapazität	12 mg (His) <sub>6</sub> -tagged Protein
STREAMLINE™ rProtein A Sepharose™ (Amersham Biosciences)	Matrix	quervernetzte Agarose, 4 %
	Partikel-Größe	80-165 µm
	Ligand	rek. Protein A ( <i>E. coli</i> ), 6 mg Protein A/mL
	Kopplungsart	Epoxy-vernetzter Ligand
	Bindungskapazität	max. 50 mg human IgG/mL

HiTrap™ Heparin HP Sepharose™ findet im Besonderen bei der Reinigung und Isolierung von DNA-bindenden Proteinen Verwendung<sup>1</sup>. Die Wechselwirkung zu Heparin basiert hier auf der hohen Ladungsdichte der polyanionischen Struktur. Das stark sulfatierte Glykosaminoglykan ist aber auch in der Lage als Ligand für eine Vielzahl von Biomolekülen zu fungieren<sup>2</sup>. Neben Lipoproteinen sind Gerinnungsenzyme (Thrombin, Faktor IX, X und XII) und Serinprotease-Inhibitoren, wie ATIII und HCII zu nennen. In allen Fällen der Interaktion mit Heparin erfolgt eine Elution durch Anhebung der Ionenstärke im Eluens.

Proteine und Peptide mit einer Affinität zu Metallionen können über eine Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) isoliert werden<sup>3</sup>. Die Metallionen werden dabei durch einen Matrix-gebundenen Chelator (Komplexbildner griech. *Chelon*, abgeleitet von *chele*, griech. Krebschere) immobilisiert. Die Bindung der Ionen findet bei neutralen pH-Werten statt, ihre Elution bei niedrigeren Werten (> 4). Gebundene Proteine werden dabei koeluiert. Eine Elution kann ebenso mittels Kompetition um das Kation (z.B. durch EDTA) oder durch Verdrängung des Proteins (durch Imidazol) erfolgen. Die verwendete HiTrap™ Chelating HP Sepharose enthält als *Chelator* gekoppeltes Iminodiacetat, einen tridentären Liganden, der bevorzugt die zweiwertigen Ionen Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> oder Fe<sup>2+</sup> bindet. Der *Chelator* bildet zu Ni<sup>2+</sup>- und Cu<sup>2+</sup>-Ionen starke Bindungen aus, zu Zn<sup>2+</sup>-Ionen eher schwache, was die Reinigung von Zink-bindenden Proteinen erschweren kann.

Bei dem Liganden der STREAMLINE™ rProtein A Sepharose™ handelt es sich um das rekombinante Protein A aus *E.coli*, welches wie seine native Variante aus *Staphylococcus*

<sup>1</sup> Farooqui, 1980

<sup>2</sup> Kjellen & Lindahl, 1991

<sup>3</sup> Porath *et al.*, 1975

*aureus* eine hohe Affinität zur F<sub>c</sub>-Region von Immunglobulinen des IgG-Typs aufweist. Diese Affinität zur F<sub>c</sub>-Region wurde bei der rekombinanten Variante durch Deletion einer Albumin-Bindestelle und mittels Einführung eines zusätzlichen Cysteins am C-Terminus verstärkt. Eine sterische Hinderung am rProtein A wurde so minimiert und die Bindungskapazität von Immunglobulinen erhöht <sup>1</sup>.

### 3.5.1.2 Anionentauscherchromatographie

Bei der Ionentauscherchromatographie trägt die Matrix Ladungen, die Moleküle mit entgegengesetzten Ladungen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen binden. Die Stärke der Assoziation hängt sowohl von der Ionenstärke als auch vom pH-Wert der Lösungen ab, welche systematisch verändert werden können, um eine effektive Trennung zu erreichen. Proteine tragen aufgrund saurer oder basischer Seitengruppen einzelner Aminosäuren negative und positive Ladungen. Durch den daraus resultierenden amphoteren Charakter von Proteinen kommt deren Nettoladung besondere Bedeutung zu. Diese Nettoladung des Proteins kann durch den pH-Wert der mobilen Phase beeinflusst werden. Zur Reinigung und Konzentrierung wurden in dieser Arbeit drei Anionentauscher-Matrices verwendet, die auf demselben Liganden basieren.

**Tabelle 3.5-2:** Charakteristika der verwendeten Anionentauschermatrixen

Mono Q <sup>®</sup> HR 5/5 MonoBeads <sup>™</sup> Column (Amersham Biosciences)	Matrix	Polystyrol vernetzt mit Divinylbenzol
	Partikel-Größe	10 µm
	Ligand	starker Anionentauscher, quartäres Ammoniumion -O-CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> -OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
	Ionenkapazität	0,27-0,37 mmol (Cl <sup>-</sup> )/mL
	Ausschlussvolumen	1 x 10 <sup>7</sup> Da
	Bindungskapazität Gelbettvolumen	20-50 mg/mL 1 mL
Resource <sup>™</sup> Q (Amersham Biosciences)	Matrix	Polystyrol vernetzt mit Divinylbenzol
	Partikel-Größe	15 µm
	Ligand	starker Anionentauscher, quartäres Ammoniumion -O-CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> -OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
	Ionenkapazität	0,27-0,37 mmol (Cl <sup>-</sup> )/mL
	Bindungskapazität	25 mg/mL
	Gelbettvolumen	1 mL
Q Sepharose <sup>™</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences)	Matrix	quervernetzte Agarose 6 %
	Partikel-Größe	90 µm (45-165 µm)
	Ligand	starker Anionentauscher, quartäres Ammoniumion -O-CH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> -OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
	Ionenkapazität	0,18–0,25 mmol (Cl <sup>-</sup> )/ml
	Ausschlussvolumen	4 x 10 <sup>6</sup> Da
	Bindungskapazität	120 mg Albumin( <i>human</i> )/mL 3 mg Thyroglobulin/mL

<sup>1</sup> Antibody Purification Handbook, Amersham Biosciences, 2003<sup>b</sup>

### 3.6 Isolierung und Reinigung von HCII aus humanem Plasma

Einige Untersuchungen zum Bindungs- oder Reaktionsverhalten wurden mit nativem HCII aus humanem Plasma vorgenommen. Zur Isolierung und Reinigung von HCII aus humanem Plasma wurde eine Kombination verschiedener Methoden verwendet. Das humane Plasma-HCII wurde zuerst durch fraktionierte Fällungen aufkonzentriert und darauf folgend chromatographisch gereinigt und weiter konzentriert. Die verwendete Reinigungsstrategie entsprach dabei weitgehend bekannten Vorschriften<sup>1</sup>. Das verwendete humane Citrat-Plasma stammt von vereinigten Blutabnahmen eines Spenders und ist laut Hersteller (Sera-Tec Biologicals Limited Partnership, North Brunswick, NJ 08902) negativ bezüglich Hepatitis B, HIV und HCV.

#### 3.6.1 Proteinfällungen mit PEG 8000 und BaCl<sub>2</sub>

Der Einfluss von Polyethylenglykol (PEG) auf die Löslichkeit von HCII ist schon länger bekannt und wurde zur HCII-Anreicherung in biologischen Proben verwendet<sup>2</sup>. PEG ist ein Polymer das die Eigenschaft besitzt, andere Polymere effektiv aus einer wässrigen Umgebung auszuschließen. So erlaubt es die Fällung von Proteinen, ohne selbst mit diesen im stärkeren Maße wechselzuwirken oder diese zu denaturieren<sup>3</sup>. Die Zugabe von Bariumchlorid ermöglicht die Fällung von Vitamin-K-abhängigen Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor IX und X, Prothrombin) über die Bildung eines Bariumcitrat-Präzipitats.

Die Aufarbeitung von Plasma-HCII wurde im Allgemeinen mit Plasmavolumen zwischen 250 und 350 mL durchgeführt. Das gefrorene Plasma wurde in einem 37 °C Wasserbad erwärmt, dabei sollte sich die Plasmalösung selbst nicht über 10 °C erwärmen. Die Fällungsschritte wurden in Analogie zu beschriebenen Methoden durchgeführt<sup>1</sup> und sind in Tabelle 3.6-1 aufgelistet.

**Tabelle 3.6-1:** Arbeitsvorschrift für die Proteinfällung aus humanem Plasma

Arbeitsschritte		
1. Proteinfällung	ad. 20 mg/mL Sojabohnen-Trypsininhibitor (Sigma) ad 5 mmol/L Benzamidin-Hydrochlorid (Sigma) ad 35 g/L PEG 8000	rühren 30 Minuten, 4 °C zentr. 2700 x g 30 Minuten, 4 °C
2. Proteinfällung	Überstand der 1. Proteinfällung $\frac{1}{10}$ Volumen einer 1 M BaCl <sub>2</sub> -Lösung zufügen	rühren 30 Minuten, 4 °C zentr. 2700 x g 30 Minuten, 4 °C

<sup>1</sup> Griffith *et al.*, 1985<sup>a</sup> ; Zhang *et al.*, 1994 ; Böhme, 2001

<sup>2</sup> Briginshaw & Shanberge, 1974

<sup>3</sup> Ingham, 1990

**Tabelle 3.6-1:** (Fortsetzung)

3. Proteinfällung	Überstand der 2. Proteinfällung <i>ad</i> 100 g/L PEG 8000 Zentrifugation	rühren 30 Minuten, RT 2700 x g 30 Minuten, RT
4. Proteinfällung	Präzipitat der 3. Proteinfällung in TC-Puffer (in Höhe des Ausgangsvolumens) resuspendieren <i>ad</i> 100 g/L PEG 8000 Zentrifugation	rühren 60 Minuten, RT 2700 x g 30 Minuten, RT
5. Proteinfällung	Überstand der 4. Proteinfällung <i>ad</i> 150 g/L PEG 8000 Zentrifugation  Präzipitat der 5. Proteinfällung in TCE-Puffer (in Höhe des Ausgangsvolumens) resuspendieren partikelfrei filtrieren (Bottle-Top Vakuumfiltrationseinheit MF75™, 0,45 µm, Nalgene®, Nunc)	rühren 60 Minuten, RT 2700 x g 30 Minuten, RT  rühren ü.N., 4 °C
Lösungen		
	TC-Puffer	50 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumcitrat, pH 7,4
	TCE-Puffer	50 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumcitrat, 5 mM EDTA, pH 7,4

### 3.6.2 Chromatographische Isolierung

Die Isolierung und Reinigung von Plasma-HCII wurde nach der Abreicherung von Fremdproteinen mittels Fällungen mit chromatographischen Methoden fortgeführt. Unter Verwendung des beschriebenen FPLC<sup>®</sup>-Systems (3.5.1) kamen zwei bis vier verschiedene chromatographische Trennungssysteme zum Einsatz. Die Anzahl der chromatographischen Trennungsschritte war dabei von der zu erzielenden Reinheit des Produktes abhängig. Als chromatographische Methoden wurden sowohl Affinitätschromatographien (3.5.1.1) und Anionenaustauscherchromatographien (3.5.1.2) eingesetzt, unter Verwendung der in Tabelle 3.5-1 und Tabelle 3.5-2 aufgeführten Säulen und Matrices. Für die Reinigung von HCII wurde unter anderen eine Heparin-konjugierte Sepharosematrix eingesetzt, wodurch die natürliche Affinität von HCII zu einem seiner Kofaktoren ausgenutzt wurde. Heparinliganden binden auch eine Vielzahl anderer Proteine und Biomoleküle. Die Ausnutzung weiterer Separationsmethoden und -bedingungen war daher notwendig. Ausgehend von dem Produkt der Proteinfällungen mit PEG 8000 und BaCl<sub>2</sub> (3.6.1), umfasste die chromatographische Isolierung von Plasma-HCII die in nachfolgender Tabelle (Tabelle 3.6-2) aufgelisteten Schritte.

**Tabelle 3.6-2:** Arbeitsvorschrift für die chromatographische Isolierung von HCII aus humanem Plasma

Chromatographie	Arbeitsschritte		
1) Heparin-Sepharose 5 mL Gelbettvolumen	HiTrap™ Heparin HP Sepharose™ (Amersham Biosciences)		
	1. Äquilibration	10 cv Puffer A	60 cm/h
	2. Probenauftrag	Produkt der Proteinfällung (ca. 250 mL)	60 cm/h
	3. Waschen	5 cv Puffer A	60 cm/h
	4. Elution	4 cv Puffer B (ca. 20 mL Pool)	30 cm/h
	Puffersystem		
	Puffer A	50 mM Tris-HCl, 20 mM Natriumcitrat, 5 mM EDTA, pH 7,4	
	Puffer B	Puffer A + 0,2 M NaCl	
	Dialyse	Dialyseschlauch 12-14 kDa MWCO (Medicell)	
	Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4	2 h, 4 °C
2) Anionentauscher 1 mL Gelbettvolumen	Resource™ Q (Amersham Biosciences)		
	1. Äquilibration	10 cv Puffer A	156 cm/h
	2. Probenauftrag	Produkt der Dialyse (ca. 20 mL)	156 cm/h
	3. Waschen	5 cv Puffer A	156 cm/h
	4. Elution	45 cv Lineargradient 0-100 % Puffer B fraktionierte Elution á 1,5 mL	156 cm/h
	Puffersystem		
	Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 7,4	
	Puffer B	Puffer A + 0,7 M NaCl	
	Dialyse	HCII-enthaltende Fraktionen (ca 200-300 mM NaCl) SnakeSkin™ Dialyseschlauch 3,5 kDa MWCO (Pierce)	
	Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4	2 h, 4 °C
3) Heparin-Sepharose 1 mL Gelbettvolumen	HiTrap™ Heparin HP Sepharose™ (Amersham Biosciences)		
	1. Äquilibration	10 cv Puffer A	156 cm/h
	2. Probenauftrag	Produkt der Dialyse (ca. 9 mL)	156 cm/h
	3. Waschen	5 cv Puffer A	156 cm/h
	4. Elution	45 cv Lineargradient 0-100 % Puffer B fraktionierte Elution á 1,5 mL	156 cm/h
	Puffersystem		
	Puffer A	20 mM Tris-HCl, 50 µM ZnCl <sub>2</sub> , pH 7,4	
	Puffer B	Puffer A + 1 M NaCl	
	Dialyse	HCII-enthaltende Fraktionen (ca 300-400 mM NaCl) SnakeSkin™ Dialyseschlauch 3,5 kDa MWCO (Pierce)	
	Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4	2 h, 4 °C
4) Anionentauscher 1 mL Gelbettvolumen	Mono Q® HR 5/5 (Amersham Biosciences)		
	1. Äquilibration	10 cv Puffer A	305 cm/h
	2. Probenauftrag	Produkt der Dialyse (ca. 5 mL)	305 cm/h
	3. Waschen	5 cv Puffer A	305 cm/h
	4. Elution	45 cv Lineargradient 0-100 % Puffer B fraktionierte Elution á 1,5 mL	305 cm/h
	Puffersystem		
	Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 7,4	
	Puffer B	Puffer A + 1 M NaCl	

Die Reinigung von Plasma-HCII fand nicht in jedem Fall über vier chromatographische Schritte statt. Plasma-HCII, welches zur Analyse der Interaktion an Heparin (3.9.2) oder Metallionen (3.9.3) diente und über immunologische Methoden detektiert werden konnte, wurde nur über zwei Säulenschritte gereinigt. Ein hoher Anspruch an Qualität und Reinheit von HCII war hingegen bei der Bestimmung der Wechselwirkung von HCII zu Heparin bei der Oberflächenplasmonresonanz (3.9.4) und der Bestimmung der intrinsischen Fluoreszenz von HCII (3.9.5) gefordert.

## 3.7 Darstellung einer Immunaффinitätsmatrix

### 3.7.1 Isolierung monospezifischer Antikörper gegen HCII aus Serum

Vertebraten bilden meist eine große Anzahl an Antikörpern, die verschiedenen *Epitope* eines Antigens identifizieren können. Jeder dieser spezifischen Antikörper wird dabei von einer anderen Variante einer Plasmazelle gebildet. Serum kann eine Vielzahl von Antikörpern gegen unterschiedliche *Epitope* eines Antigens enthalten und ist somit eine ideale Quelle für polyklonale Antikörper, die auch verschiedene Varianten eines bestimmten Proteins binden. Für die Isolierung verschiedener rHCII-Varianten aus Zellkulturen (3.8) über eine zu erstellende Immunaффinitätsmatrix waren polyklonale Antikörper aus Serum daher besonders geeignet. Die Anreicherung und Isolierung von Antikörpern aus Serum erfolgt meistens über Protein A- oder Protein G-Matrices, die unspezifisch alle Immunglobuline binden. In dieser Weise konzentrierte Antikörperlösungen besitzen eine heterogene Zusammensetzung und zeigen bei vielen Anwendungen häufig Nebenreaktionen und unspezifische Bindungseigenschaften.

In dieser Arbeit erfolgte die Anreicherung monospezifischer Antikörper über eine Antigen-Aффinitätsreinigung an einer HCII-Aффinitätsmatrix. Diese Matrix wurde während einer Diplomarbeit vom W. Komyod erstellt<sup>1</sup>. Gereinigtes HCII aus humanem Plasma wurde über die N-Glykane mit EZ-Link<sup>™</sup>-Biotin-LC-Hydrazid (Pierce) biotinyliert. Die Immobilisierung des biotinylierten HCIIs wurde an HiTrap<sup>™</sup> Streptavidin HP Sepharose<sup>™</sup> (Amersham Biosciences) vorgenommen. Aufgrund der hohen Affinität zwischen Biotin und Streptavidin wurde Biotin-HCII nahezu quantitativ an die Matrix gekoppelt.

Die Antigen-spezifische Isolierung von monospezifischen Antikörpern generierte eine hochreine Immunglobulinlösung, die nun ausschließlich die gewünschten HCII-bindenden Antikörper enthielt. Das Anti-HCII-IgG enthaltende Kaninchenserum wurde mit Auftragspuffer (Puffer A) 1:1 verdünnt, um den korrekten pH-Wert für die Bindung zu erreichen und zusätzlich mit PMSF (Endkonzentration 1 mM) versetzt. Der Bindung der Anti-HCII-Immunglobuline an der Antigen-Aффinitätsmatrix erfolgte mit Hilfe des FPLC<sup>®</sup>-Systems

---

<sup>1</sup> Komyod, 2001

(3.5.1) über eine Injektionsschleife. Zur Maximierung der Antikörperausbeute zirkulierte die Serumlösung an der Matrix unter Verwendung der Peristaltikpumpe P-1 für 45 Minuten. Zur Elution der anti-HCII-Antikörper wurde der *Gentle Elution Buffer Ag/Ab* (Pierce) eingesetzt, welcher eine Elution von der Antigen-Affinitätsmatrix unter milden Bedingungen ermöglichte. Nach der Elution wurde die Säule mit Puffer C regeneriert. Dabei wurden weitere, stark bindende Antikörper eluiert, die jedoch keine Verwendung bei der Darstellung einer Immunitätsmatrix fanden. Nur solche Antikörper, die unter milden Bedingungen eluierten, erlauben auch eine Isolierung von rHCII an einer IgG-Matrix unter den gleichen milden Elutionsbedingungen (3.8). Durch die beschriebene Vorgehensweise wurde 6 mL Serum bearbeitet, aus denen insgesamt ca. 3 mg Anti-human-HCII-Antikörper isoliert wurden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte densitometrisch über eine SDS-PAGE (3.4.2) und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung unter Verwendung der Auswertungssoftware WinCam (Version 2.2, Cybertech).

**Tabelle 3.7-1:** Arbeitsvorschrift für die Isolierung von Anti-human HCII-Immunglobulinen aus Serum

Arbeitsschritte																
1) Probenvorbereitung	0,5 mL Serum (Kaninchenserum Kan1, 30.11.1989, immunisiert mit rekombinantem HCII aus CHO-Zellkulturen, H. Ragg, pers. Mitteilung) 1:1 mit Puffer A verdünnt zentrifugiert 20000 x g, 5 Minuten															
2) Chromatographie	HCII-Affinitätsmatrix <sup>1</sup>															
1 mL Gelbettvolumen	<table border="0"> <tr> <td>1. Äquilibrierung</td> <td>5 cv Puffer A</td> <td>153 cm/h</td> </tr> <tr> <td>2. Probenauftrag</td> <td>Serumlösung 1 mL, 45 Minuten im Kreislauf</td> <td>153 cm/h</td> </tr> <tr> <td>3. Waschen</td> <td>10 cv Puffer A</td> <td>153 cm/h</td> </tr> <tr> <td>4. Eluieren</td> <td>5 cv Puffer B</td> <td>153 cm/h</td> </tr> <tr> <td>5. Regeneration</td> <td>3 cv Puffer C</td> <td>153 cm/h</td> </tr> </table>	1. Äquilibrierung	5 cv Puffer A	153 cm/h	2. Probenauftrag	Serumlösung 1 mL, 45 Minuten im Kreislauf	153 cm/h	3. Waschen	10 cv Puffer A	153 cm/h	4. Eluieren	5 cv Puffer B	153 cm/h	5. Regeneration	3 cv Puffer C	153 cm/h
1. Äquilibrierung	5 cv Puffer A	153 cm/h														
2. Probenauftrag	Serumlösung 1 mL, 45 Minuten im Kreislauf	153 cm/h														
3. Waschen	10 cv Puffer A	153 cm/h														
4. Eluieren	5 cv Puffer B	153 cm/h														
5. Regeneration	3 cv Puffer C	153 cm/h														
3) Dialyse und Konzentration	Dialyseschlauch 12-14 kDa MWCO (Medicell), 3 x 0,5 L Puffer D Microsep <sup>TM</sup> Mikrokonzentratoren (MWCO 30 kDa, Pall Life Sciences), 5000 x g, 4 °C															
Puffersystem																
Puffer A	30 mM Tris-HCl, 20 mM Acetat, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl, pH 8,0															
Puffer B	<i>ImmunoPure<sup>®</sup> Gentle Elutionbuffer Ag/Ab</i> (Pierce), pH 6,55															
Puffer C	0,1 M Glycin, pH 3,0															
Puffer D	0,2 M Natriumborat, 0,5 M NaCl, pH 8,5															

<sup>1</sup> Komyod, 2001

### 3.7.2 Chemische Kopplung eines Anti-human-HCII Antikörpers an rProtein-A

Herkömmliche Methoden zur Immobilisierung von Antikörpern an stationären Phasen verwenden Bromcyan- oder NHS-aktivierte Sepharosen<sup>1</sup>. Die Bindung über primäre Amine des Immunglobulins ist dabei nicht gerichtet und generiert häufig Affinitätsmatrices mit geringer Aktivität der IgGs. Die mögliche variable Orientierung des Antikörpers an die Matrix unterbindet teilweise eine effiziente Antigen/Antikörper-Interaktion durch sterische Hinderungen. Protein A aus *Staphylococcus aureus* (3.5.1.1) bindet Antikörper über ihre F<sub>c</sub>-Region und somit in einer gerichteten Positionierung. Durch chemische Kopplung der gebundenen Antikörper lässt sich eine Immunomatrix erstellen, die die Antikörper in optimaler Orientierung präsentiert, um eine hoch effiziente Wechselwirkung mit dem Antigen zu ermöglichen<sup>2</sup>. In dieser Weise erstellte stabile Matrices zeigen keinen erkennbaren Verlust des Antikörpers während ihrer Nutzung und eignen sich für Reinigungsprozeduren im Mikro- wie auch im Großmaßstab.

Die in dieser Arbeit angewandte Immobilisierung der Antikörper richtete sich im wesentlichen nach bekannten Vorschriften<sup>3</sup> und ist in der nachfolgenden Tabelle (3.7-2) aufgeführt.

**Tabelle 3.7-2:** Arbeitsvorschrift für die kovalente Kopplung von Antikörpern an rProtein A-Sepharose

Arbeitsschritte	
Probenvorbereitung	3 mg Anti-human-HCII IgG in 10 mL Puffer A verdünnt, <i>ad.</i> 1 mM PMSF, zentrifugiert 20000 x g, 5 Minuten
Affinitätsmatrix	STREAMLINE™ rProtein A Sepharose™ (Amersham Biosciences) 3 mL Gelvolumen (gv)
1. Equilibrierung	5 gv Puffer A zentr. 1500 x g
2. Antikörperbindung	10 mL (0,3 mg/mL) Antikörperlösung, Matrix 1 Stunde bei RT inkubieren zentr. 1500 x g
3. Waschen	2 x 3 gv Puffer B zentr. 1500 x g
4. chem. Kopplung	Matrix 1 Stunde in 10 mL Puffer C bei RT inkubieren
5. Waschen	2 x 5 gv Puffer B zentr. 1500 x g 5 gv Puffer D zentr. 1500 x g
6. Inaktivierung	Matrix mit 3 gv Puffer D, 2 Stunde bei RT inkubieren zentr. 1500 x g
7. Waschen	3 x 5 gv Puffer A zentr. 1500 x g
Puffersystem	
Puffer A	0,2 M Natriumborat, 0,5 M NaCl, pH 8,5
Puffer B	0,2 M Natriumborat, pH 9,0
Puffer C	0,2 M Natriumborat, pH 9,0, 20 mM DMP (frisch zugegeben)
Puffer D	0,2 M Ethanolamin, pH 8,0

<sup>1</sup> Wilchek & Jakoby, 1974

<sup>2</sup> Gersten & Marchalonis, 1978, Reeves *et al.*, 1981

<sup>3</sup> Schneider *et al.*, 1982; Karlsson & Platt, 1991; Accoceberry *et al.*, 2001

Die Kopplung der gereinigten Anti-human-HCII-IgGs wurde an STREAMLINE™ rProtein A (Tabelle 3.5-1) vorgenommen, da Immunglobuline des Isotyps G aus Kaninchen eine höhere Affinität zu Protein A als zu Protein G haben. Die chemische Vernetzung zwischen IgG und Protein A wurde durch das bifunktionelle Reagenz Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid (DMP, Fluka) hergestellt. Die Verknüpfung erfolgt dabei über primäre Amine von Protein A und vom F<sub>c</sub>-Bereich des Immunglobulins. Für die Kopplungsreaktion ist ein pH-Wert oberhalb von 8,2 notwendig. Da im Verlauf der chemischen Reaktion das Puffersystem angesäuert wird, wurde Puffer C mit einem pH-Wert von 9,0 eingesetzt, welcher über die ganze Reaktionsdauer die Aufrechterhaltung eines basischen Milieus gewährleistet. Durch Entnahme kleiner Proben nach jedem Arbeitsschritt konnte die erfolgreiche kovalente Kopplung der Antikörper an rProtein A durch eine SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (3.4.2) überprüft werden.

### 3.8 Isolierung von rHCII-Varianten aus Zellkulturen

Die rekombinanten HCII-Varianten wurden aus CHO-Zellen exprimiert und pro Variante ein Kulturüberstandsvolumen von bis zu einem Liter gesammelt (3.3.1 & 3.3.5). Bei einer Produktbildungsrate von nur ~ 0,4 – 3,2 µg HCII pro 10<sup>6</sup> Zellen und Tag und dem großen Volumen war eine Aufkonzentrierung der Kulturüberstände notwendig. Auf Membranen basierende Konzentrierungssysteme (z.B. Ultrafiltration) führen häufig zu hohen Verlusten an Quantität und Aktivität der Proteine, so dass hier eine Affinitätschromatographie mit einem starken Ionenaustauscher als Konzentrierungsschritt eingesetzt wurde.

#### 3.8.1 Konzentrierung über Ionenaustauschchromatographie

Zur Konzentrierung von Kulturüberständen wurde der starke Anionenaustauscher Q Sepharose™ Fast Flow (Tabelle 3.5-2) verwendet. Die Chromatographie wurde in einer XK 16/20 Säule (Amersham Biosciences) vorgenommen, welche über einen temperierbaren Außenmantel verfügt. Durch ein angeschlossenes Kühlaggregat konnte die chromatographische Konzentrierung bei 6 °C durchgeführt werden. Die Konzentrierung erfolgte bei pH 8,0, was eine Bindung aller Proteine mit einem pI (isoelektrischer Punkt) kleiner 7,0 ermöglichen sollte. HCII weist einen pI zwischen 4,8 und 5,2 auf<sup>1</sup> und sollte quantitativ gebunden werden. Die Kulturmedien wurden vor Bearbeitung mit einem 1/100 Volumen Puffer D (Tabelle 3.8-1) und PMSF (Endkonzentration 1 mM) sowie 1 g/L PEG 8000 versetzt und durch Druckfiltration (Bottle-Top Vakuumfiltrationseinheit MF75™, 0,45 µm, Nalgene®, Nunc) am Wasserstrahlvakuum partikelfrei filtriert. Die Regeneration der Säulenmatrix nach durch-

---

<sup>1</sup> Tollefsen *et al.*, 1982

geführter Chromatographie erfolgte unter harschen Bedingungen (Puffer C, Tabelle 3.8-1), um zu gewährleisten, dass kein verbleibendes Protein eine nachfolgende Konzentrierung einer anderen HCII-Variante kontaminiert. Die chromatographische Konzentrierung wurde mit Hilfe des FPLC<sup>®</sup>-Systems (3.5.1) durchgeführt und ist in der folgenden Tabelle 3.8-1 im Einzelnen beschrieben.

**Tabelle 3.8-1:** Arbeitsvorschrift für die Konzentrierung über Ionenaustauschchromatographie

Arbeitsschritte	
1) Probenvorbereitung	0,6 – 1 Liter Kulturüberstand, 1:100 mit Puffer D versetzt 1 mM PMSF, 1 g/L PEG 8000, filtriert (0,45 µm, Nalgene <sup>®</sup> )
2) Chromatographie	XK 16/20 Säule (Amersham Biosciences), 6 °C Q Sepharose <sup>™</sup> Fast Flow (Amersham Biosciences), 25 mL Gelbett
	1. Äquilibration      5 cv Puffer A      120 cm/h
	2. Probenauftrag      Kulturüberstand (0,6 – 1 L)      120 cm/h
	3. Waschen      4 cv Puffer A      120 cm/h
	4. Eluieren      ca 40 mL Puffer B      120 cm/h
	Eluat 0,02 % (w/v) NaN <sub>3</sub> zufügen
	5. Regeneration      3 cv Puffer C      120 cm/h
Puffersystem	
Puffer A	20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Puffer B	20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,5 M NaCl, pH 8,0
Puffer C	1 M NaCl, 1 M NaOH
Puffer D	1 M Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0

### 3.8.2 Immunoaffinitätsreinigung von rHCII

Das Eluat der Konzentrierung über Ionenaustauschchromatographie konnte direkt zur weiteren Isolierung der rekombinanten HCII-Varianten an einer Immunoaffinitätsmatrix eingesetzt werden. Die Reinigung wurde in einem 50 mL Reaktionsgefäß (Nunc) durch einen Stufenprozess in Form eines *Batches* durchgeführt. Die einzelnen Inkubationsschritte erfolgten bei Raumtemperatur auf einem Schwenkschüttler (Duomax 1030, Heidolph). Die Sedimentation der Gelmatrix zwischen den Inkubationen wurde durch Zentrifugation (2000 rpm, 5 Minuten, Megafuge 1.0, Heraeus) erreicht. Das verwendete Puffersystem bestand aus ImmunoPure<sup>®</sup> Gentle Ag/Ab Puffern (Pierce) und wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers eingesetzt <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Antibody Binding and Elution Buffer Instruction Book, Pierce, 2001

**Tabelle 3.8-2:** Arbeitsvorschrift für die Immunoaffinitätsreinigung von rHCII

Arbeitsschritte		
Probenvorbereitung	40 mL Eluat, 1:10 mit Puffer A versetzt	
Affinitätsmatrix	Immunoaffinitätsmatrix (siehe 3.7), 5 mL Gelvolumen (gv)	
1. Äquilibrierung	1 gv Puffer A	zentr. 1500 x g
2. rHCII-Bindung	44 mL Proteinlösung und Matrix 1 Stunde bei RT unter leichtem Schwenken inkubieren	zentr. 1500 x g
3. Waschen	3 x 3 gv Puffer A	zentr. 1500 x g
4. Eluieren	4 x Matrix 15 Minuten in 5 mL Puffer B bei RT inkubieren Eluatfraktionen vereinen (ca. 20 ml)	zentr. 1500 x g
5. Regenerieren	2 x 3 gv Puffer C	zentr. 1500 x g
Puffersystem		
Puffer A	<i>ImmunoPure</i> <sup>®</sup> <i>Gentle Binding Buffer</i> Ag/Ab (Pierce), pH 8,0	
Puffer B	<i>ImmunoPure</i> <sup>®</sup> <i>Gentle Elution Buffer</i> Ag/Ab (Pierce), pH 6,55	
Puffer C	0,1 M Glycin, pH 3,0	

### 3.8.3 Dialyse und Produktkonzentrierung

Die Elution von rekombinantem HCII durch den *Gentle Elution Buffer* Ag/Ab (Pierce) basiert auf dem Einfluss hochkonzentrierter Ionenlösungen. Eine Dialyse der Eluate erfolgte daher unmittelbar im Anschluss an die Immunoaffinitätsreinigung, da hochionische Lösungen einen negativen Einfluss auf die Proteinfaltung haben können. Die Dialyse (SnakeSkin™ Dialyseschlauch 10 kDa MWCO, Pierce) wurde gegen dreimal 2 Liter Puffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4) bei 4 °C für 12 Stunden durchgeführt. Aufgrund der hohen Osmolarität des Eluates kam es bei Dialyse zu einer Volumengrößervergrößerung auf ca. 50 mL. Das Dialysat wurde auf Eis gelagert und durch Mikrokonzentratoren (Centriprep-10, 10 kDa MWCO, Millipore) in einer Kühlzentrifuge (Cryofuge 6000, Heraeus Sepatech, 2000 x g, 4 °C) auf ein Volumen von 1 mL eingeeengt. Filtrat und Retentat der Konzentrierung wurden auf ihren HCII-Gehalt durch ELISA (3.4.1.1) kontrolliert und die Reinheit über SDS-PAGE (3.4.2.1) verifiziert. Das Retentat wurde á 50 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Proteinkonzentration im Retentat wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm mit den individuellen Extinktionskoeffizienten der rHCII-Varianten bestimmt, wie unter 3.4.1.2 beschrieben.

## 3.9 Analytik

### 3.9.1 Komplexierung von HCII mit $\alpha$ -Thrombin

Rekombinante Varianten von HCII aus CHO-Zellen wurden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität überprüft. Dabei wurde die Eigenschaft von HCII ausgenutzt, kovalente SDS-stabile Komplexe mit der Serinprotease  $\alpha$ -Thrombin einzugehen<sup>1</sup>. Die Komplexierung erfolgte direkt mit den Kulturüberständen und wurde durch Zugabe der Glykosaminoglykane Heparin und Dermatansulfat beschleunigt. Die Komplexierungsansätze wurden in reduzierenden Probenpuffer aufgenommen und mit Hilfe einer SDS-PAGE sowie eines Western-Blots analysiert.

Die Fraktionierung von HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexen an Heparin-Sepharose<sup>TM</sup> wurde ohne Zusatz von Glykosaminoglykanen bei der Komplexbildung vorgenommen. Bei der Fraktionierung hätte gelöstes Heparin im Analyten die Bindung an immobilisiertes Heparin unterbunden.

**Tabelle 3.9-1:** Bedingungen der HCII-Komplexierungen mit  $\alpha$ -Thrombin

Inhibierung von $\alpha$ -Thrombin durch rHCII aus Kulturüberständen		
50 $\mu$ L CHO-Kulturüberstände		
1 $\mu$ L Dermatansulfatlösung oder 10 $\mu$ L Heparinlösung		
1 $\mu$ L Thrombinlösung		20 Minuten bei 25 °C inkubieren
Inhibierung von $\alpha$ -Thrombin zur Fraktionierung von HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexen		
20 $\mu$ g gereinigtes HCII aus Plasma		
5,26 $\mu$ g Thrombin (50 $\mu$ L Thrombinlösung)		30 Minuten bei 25 °C inkubieren
	Lösungen	
Komplexierungspuffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000	
Dermatansulfatlösung	20 mg/L Dermatansulfat in Komplexierungspuffer	
Heparinlösung	100 U/mL Heparin in Komplexierungspuffer	
Thrombinlösung	306 NIH Units/mL $\alpha$ -Thrombin in Komplexierungspuffer	

<sup>1</sup> Tollefsen & Blank, 1981

### 3.9.2 Heparin-Affinitätschromatographie in Gegenwart bivalenter Kationen

Heparin-Affinitätschromatographie ist ein gebräuchliches Verfahren zur Bestimmung von relativen Affinitäten von heparinbindenden Proteinen zu dem immobilisierten Liganden<sup>1</sup>. Als Maß der Bindungsaffinitäten gelten dabei die zur Elution der gebundenen Proteine notwendigen Natriumchloridkonzentrationen. Zur Bestimmung der relativen Affinitäten wurde eine 1 mL HiTrap<sup>™</sup> Heparin HP Sepharose<sup>™</sup> Matrix (Tabelle 3.5-1) in Kombination mit dem FPLC<sup>®</sup>-System (3.5.1) verwendet. Vergleichbare Elutionsbedingungen wurden durch Einsatz der Steuerungssoftware (FPLC<sup>®</sup>-Director, Version 1.10, Pharmacia) gewährleistet. Die Elution wurde durch einen linear ansteigenden Natriumchlorid-Gradienten erzielt deren Eluat fraktioniert gesammelt, und die eluierten Proteine (ATIII, HCII und  $\alpha$ -Thrombin) mit Hilfe eines Western-Blots detektiert. Auch eine Komplexierungsreaktion von HCII und  $\alpha$ -Thrombin (3.9.1) konnte durch diese Methode hinsichtlich der Heparin-Wechselwirkung ihrer Komponenten untersucht werden. Die relativen Bindungsaffinitäten wurden bei unterschiedlichen Bindungs- und Elutionsbedingungen betrachtet. Dazu wurden dem Puffersystem der Chromatographie verschiedene Ionen zugefügt, um deren Einfluss auf das Bindungsverhalten der Proteine zu Heparin zu bestimmen.

**Tabelle 3.9-2:** Arbeitsvorschrift für die Bestimmung von Bindungsaffinitäten an Heparin-Sepharose<sup>™</sup>

Arbeitschritte			
1) Probenvorbereitung	a) 20-50 $\mu$ g Plasma-HCII in 100-500 $\mu$ L Puffer A b) 5 $\mu$ g ATIII (Roche Diagnostics) in 100 $\mu$ L Puffer A c) 5 $\mu$ g $\alpha$ -Thrombin (Sigma) in 100 $\mu$ L Puffer A d) Komplexierungsansatz (3.9.1) in 250 $\mu$ L Puffer A		
2) Chromatographie	HiTrap <sup>™</sup> Heparin HP Sepharose <sup>™</sup> (Amersham Biosciences)		
1 mL Gelbettvolumen	1. Äquilibrierung	5 cv Puffer A	153 cm/h
	2. Probenauftrag	100 - 500 $\mu$ L über Injektionsschleife	153 cm/h
	3. Waschen	10 cv Puffer A	153 cm/h
	4. Eluieren	45 cv Lineargradient 0-100 % Puffer B fraktionierte Elution á 1,5 mL	153 cm/h
Puffersystem			
	Puffer A	20 mM Tris-HCl, pH 7,4	
	Puffer B	20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 7,4	
	Je nach Versuchsbedingungen wurden beiden Puffern Ionen zugefügt. 15-100 $\mu$ M ZnCl <sub>2</sub> , 50 $\mu$ M CuCl <sub>2</sub> , 50 $\mu$ M NiCl <sub>2</sub> , 50 $\mu$ M MnCl <sub>2</sub> , 50 $\mu$ M CoCl <sub>2</sub> , 50 $\mu$ M CdCl <sub>2</sub> , 1000 $\mu$ M CaCl <sub>2</sub> oder 1000 $\mu$ M MgCl <sub>2</sub>		

<sup>1</sup> Hayakawa *et al.*, 2002; Liaw *et al.*, 1999; Hoke *et al.*, 2000

### 3.9.3 Metallionen-Affinitätschromatographie von Plasma-HCII

Die Methode der Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC, engl. *immobilized metal affinity chromatography*) galt als Verfahren zur Reinigung kleiner Moleküle und wurde anfangs als *ligand exchange chromatography* (LAC) eingeführt<sup>1</sup>. Ihre praktische Anwendung sowie ihre Bedeutung als Technik zur Reinigung von Proteinen und hochmolekularen Biopolymeren erlangte die Methode erst später<sup>2</sup>. Heute ist die Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ein gebräuchliches Werkzeug bei der Reinigung von *poly-His*-konjugierten rekombinanten Proteinen<sup>3</sup>. Auch native Proteine mit Affinität zu Metallionen lassen sich durch Nutzung der IMAC isolieren und reinigen. Dabei kommen Ionen der Übergangsmetalle, wie  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  an immobilisierten Chelatbildnern zum Einsatz. Die Selektivität der Proteinbindung in IMAC-Prozessen steigt in folgender Reihenfolge:  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ . Die Quantität der Proteinbindung nimmt aber in der gleichen Reihenfolge ab<sup>4</sup>. Die Interaktionen zwischen dem immobilisierten Metallion und dem Protein sind komplex und umfassen verschiedene Effekte wie elektrostatische (ionische), hydrophobe sowie Donor-/Akzeptor-Wechselwirkungen. Deren Einfluss auf die Bindung wird durch die Art des Chelatbildners, des Metallions, den bindenden Aminosäuren, sowie dem Milieu (Art des Puffers, pH-Wert) bestimmt<sup>5</sup>.

Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) ist eine häufig verwendete Methode zur Bestimmung von Metallionenaffinitäten von Proteinen<sup>6</sup>. In dieser Arbeit wurden die Fähigkeiten von HCII zur Bindung an Zinkionen durch eine IMAC an Imidodiacetat (IDA) untersucht. Dazu wurde eine chromatographische Fraktionierung von HCII an HiTrap<sup>TM</sup> Chelating HP Sepharose<sup>TM</sup> (Tabelle 3.5-1) unter Verwendung des FPLC<sup>®</sup>-Systems durchgeführt. Die Säulenmatrix musste dazu erst mit dem entsprechenden Kation beladen werden, bevor eine Bindung des Proteins erfolgen konnte. Die Elution wurde durch kompetitive Verdrängung von HCII durch Imidazol oder durch Entfernung des Kations mit EDTA erreicht. Imidazol ist strukturell der Aminosäure Histidin ähnlich, besitzt aber die Eigenschaft  $\text{Ni}^{2+}$  oder  $\text{Zn}^{2+}$  stärker zu koordinieren. Ebenso besitzt EDTA eine größere Komplexbildungskonstante für die meisten zweiwertigen Kationen als IDA. Als Kontrollprotein wurde  $\alpha$ -Thrombin verwendet. Die Bedingungen der IMAC sind in folgender Tabelle 3.9-3 aufgeführt.

---

<sup>1</sup> Helferich, 1961; Davankov *et al.*, 1974

<sup>2</sup> Porath *et al.*, 1975

<sup>3</sup> Hochuli *et al.*, 1987; Porath, 1992

<sup>4</sup> Hemdan & Porath, 1985

<sup>5</sup> Wittler, 2000

<sup>6</sup> Bush *et al.*, 1994 ; Yip *et al.*, 1989 ; Chavakis *et al.*, 1999

**Tabelle 3.9-3:** Arbeitsvorschrift der Metallionen-Affinitätschromatographie an IDA-Sepharose™

Arbeitsschritte																															
1) Probenvorbereitung	20 µg gereinigtes Plasma-HCII in 50 µL Puffer A 5 µg $\alpha$ -Thrombin (Sigma) in 50 µL Puffer A																														
2) Chromatographie	HiTrap™ Chelating HP Sepharose™ (Amersham Biosciences)																														
1 mL Gelbettvolumen	<table border="0"> <tr> <td>1. Beladen</td> <td>5 cv ZnCl<sub>2</sub>-Lösung (10 mM)</td> <td>76 cm/h</td> </tr> <tr> <td>2. Waschen</td> <td>5 cv deionisiertes Wasser</td> <td>76 cm/h</td> </tr> <tr> <td>3. Äquilibrierung</td> <td>5 cv Puffer A</td> <td>76 cm/h</td> </tr> <tr> <td>4. Probenauftrag</td> <td>50 µL Probe über Injektionsschleife</td> <td>76 cm/h</td> </tr> <tr> <td>5. Waschen</td> <td>5 cv Puffer A</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6. Eluieren</td> <td>30 cv Lineargradient, 0-100 % Puffer B</td> <td>76 cm/h</td> </tr> <tr> <td></td> <td>fraktionierte Elution á 1 mL</td> <td></td> </tr> <tr> <td>oder</td> <td>Stufengradient, 10, 33, 100 % Puffer B</td> <td>76 cm/h</td> </tr> <tr> <td>oder</td> <td>2 cv Puffer C, fraktionierte Elution á 1,5 mL</td> <td>76 cm/h</td> </tr> <tr> <td>7. Regeneration</td> <td>5 cv 1 mM EDTA</td> <td>306 cm/h</td> </tr> </table>	1. Beladen	5 cv ZnCl <sub>2</sub> -Lösung (10 mM)	76 cm/h	2. Waschen	5 cv deionisiertes Wasser	76 cm/h	3. Äquilibrierung	5 cv Puffer A	76 cm/h	4. Probenauftrag	50 µL Probe über Injektionsschleife	76 cm/h	5. Waschen	5 cv Puffer A		6. Eluieren	30 cv Lineargradient, 0-100 % Puffer B	76 cm/h		fraktionierte Elution á 1 mL		oder	Stufengradient, 10, 33, 100 % Puffer B	76 cm/h	oder	2 cv Puffer C, fraktionierte Elution á 1,5 mL	76 cm/h	7. Regeneration	5 cv 1 mM EDTA	306 cm/h
1. Beladen	5 cv ZnCl <sub>2</sub> -Lösung (10 mM)	76 cm/h																													
2. Waschen	5 cv deionisiertes Wasser	76 cm/h																													
3. Äquilibrierung	5 cv Puffer A	76 cm/h																													
4. Probenauftrag	50 µL Probe über Injektionsschleife	76 cm/h																													
5. Waschen	5 cv Puffer A																														
6. Eluieren	30 cv Lineargradient, 0-100 % Puffer B	76 cm/h																													
	fraktionierte Elution á 1 mL																														
oder	Stufengradient, 10, 33, 100 % Puffer B	76 cm/h																													
oder	2 cv Puffer C, fraktionierte Elution á 1,5 mL	76 cm/h																													
7. Regeneration	5 cv 1 mM EDTA	306 cm/h																													
Puffersystem																															
Puffer A	20 mM Natriumphosphat, 0,5 M NaCl, pH 7,4																														
Puffer B	20 mM Natriumphosphat, 0,55 M NaCl, 150 mM Imidazol, pH 7,4																														
Puffer C	20 mM Natriumphosphat, 0,55 M NaCl, 50 µM EDTA, pH 7,4																														

Die Detektion von HCII oder  $\alpha$ -Thrombin in den Eluaten wurde mittels Western-Blotting (3.4.3) oder eines ELISA (3.4.1.1) durchgeführt.

### 3.9.4 Oberflächenplasmonresonanz

Neben der Kenntnis von strukturellen Aspekten chemischer oder biochemischer Moleküle ist unter anderem ihre Wechselwirkung miteinander von Interesse. Vor allem die Spezifität einer Interaktion hinsichtlich Geschwindigkeit und Intensität ist von Bedeutung. Die Oberflächenplasmonresonanz (engl.: *Surface Plasmon Resonance*; SPR) ist eine Methode der Interaktionsanalyse mit hoher Empfindlichkeit. Sie besitzt die Fähigkeit schnellste Reaktionen zu detektieren und ist somit auch in der Lage dynamische Prozesse in einem Zeitbereich von wenigen Millisekunden *on-line* zu verfolgen. Gegenüber anderen Methoden der Interaktionsanalyse bietet die Oberflächenplasmonresonanz den Vorteil, dass der zu untersuchende Analyt nicht modifiziert werden muss (durch Fluoreszenz- oder radioaktive Markierung), um eine Detektion zu ermöglichen. Die Oberflächenplasmonresonanz wird verwendet, um die Interaktion zwischen einem immobilisierten Liganden und einem im umgebenen Flusssystem befindlichen Reaktionspartner (Analyt) zu untersuchen. Die stationäre Phase wird aus dem Sensorchip, einem goldbeschichteten Glaskörper mit immobilisierten Liganden, gebildet<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Welford, 1991; Kooyman *et al.*, 1988

Das Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz beruht auf der Ausbreitung von Lichtwellen an der Grenzfläche zweier optisch unterschiedlich dichter Medien. An der Phasengrenze zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes kommt es zur Totalreflexion des eingestrahnten Lichtes. Dabei wird ein elektrisches Feld erzeugt („evaneszente Welle“), welches in der Lage ist, freie Oberflächenelektronen in dünnen Edelmetallfilmen (*surface plasmons*) in Schwingung zu versetzen. Die Intensität des an der Grenzfläche reflektierten Lichtes nimmt proportional zur Anregung der Elektronen in der Metallschicht ab. Das Ausmaß der Schwingungsanregung ist abhängig von den Eigenschaften des Edelmetallfilms, welche auch von seiner nächsten Umgebung beeinflusst werden. Chemische oder physikalische Änderungen an der Grenzschicht des Metallfilms führen zu einer veränderten Schwingungsfrequenz der Elektronen, welche auch die Intensität des totalreflektierten Lichtes an der Grenzfläche beeinflusst<sup>1</sup>. Im Verlauf eines SPR-Experiments kommt es am Sensorchip zur Anlagerung von Proteinen oder anderen Molekülen, welche eine Änderung des Brechungsindex in der Nähe der Sensoroberfläche verursachen<sup>2</sup>. Diese Änderungen sind proportional zur angelagerten Masse und lassen sich als Varianz in der Intensität des reflektierten Lichtes detektieren<sup>3</sup>.

Auf weitere Aspekte der Oberflächenplasmonresonanz, ihre physikalischen Grundlagen und die Bindungskinetik, kann hier nicht näher eingegangen werden. Sie sind im Einzelnen in der Literatur beschrieben<sup>4</sup>.

In dieser Arbeit wurde die Oberflächenplasmonresonanz eingesetzt, um die Wechselwirkung zwischen HCII und Heparin näher zu charakterisieren. Verwendet wurde dazu das BIAcore<sup>®</sup> 3000 System (Biacore AB, Uppsala, Schweden), welches die Beobachtung des zeitlichen Verlaufs der Bindung von Makromolekülen an einen Liganden ermöglicht. Die Bindung eines Analyten an eine Ligandmatrix in Abhängigkeit von der Zeit, wird als Sensorgramm dargestellt. Die Massenänderung an der Chipoberfläche wird in *response units* (RU) angegeben. Die Änderung um eine RU beschreibt dabei einen Massenunterschied von 1 Picogramm/mm<sup>2</sup>. Die Interaktionsuntersuchungen wurden bei 25 °C durchgeführt, mit Hilfe der BIAcore 3000 Steuerungssoftware (Version 3.1.1) kontrolliert und mit der BIAevaluation Software (Version 3.1) analysiert. Um Störungen der Messungen zu minimieren wurden alle verwendeten Puffer und Probenlösungen vor Verwendung entgast und sterilfiltriert (0,2 µm, Minisart<sup>®</sup> Plus, Sartorius).

---

<sup>1</sup> Rich & Myszka, 2000, Hall, 2001

<sup>2</sup> Johnsson *et al.*, 1991

<sup>3</sup> Stenberg *et al.*, 1991

<sup>4</sup> Rothenhäusler & Knoll, 1988; Malmqvist *et al.*, 1993; Perez-Howard *et al.*, 1995; Rippe, 1997  
Steiner *et al.*, 1999; BIAcore 3000 Instrument Handbook, Biacore AB, 2002

### 3.9.4.1 Immobilisierung von biotinyliertem Heparin

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Interaktionsstudien wurden mit einem Sensorchip SA (Biacore AB, Uppsala, Schweden) vorgenommen. Der Chip besitzt auf der Goldlage eine 50 nm dicke Dextranmatrix, auf welcher Streptavidin immobilisiert ist. Dadurch kann der Sensorchip SA eine Vielzahl biotinylierter Verbindungen aufnehmen und bietet damit die Möglichkeit, den Chip auf einfache Weise vielfältig zu funktionalisieren. Biotin und biotinylierte Substanzen haben eine hohe Affinität zu Streptavidin, der rekombinanten, bakteriellen Variante von Avidin aus *Streptomyces avidinii*. Die starke Bindung von Biotin an Streptavidin ( $K_a > 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ) wird häufig genutzt um Biotinkonjugate an einer Streptavidinmatrix zu immobilisieren oder um biotinylierte Proteine und Zellrezeptoren zu detektieren. Da Biotin ein vergleichsweise kleines Molekül ist, kann es an Makromoleküle konjugiert werden, ohne das dadurch deren Charakteristika wie Größe, physikalische und biologische Eigenschaften verändert werden <sup>1</sup>.

In dieser Arbeit wurde der Sensorchip SA mit einem Heparin-Biotin-Konjugat (MW 15 kDa, Calbiochem, Merck Biosciences) modifiziert. Neben der so geschaffenen Messzelle blieb eine weitere Flusszelle als Referenzoberfläche unbehandelt. Vor der eigentlichen Immobilisierung wurde der Chip mit 50 mM NaOH inkubiert, um die bei der Produktion aufgebrauchte Schutzschicht von der Chipoberfläche zu entfernen. Die Immobilisierung erfolgte mit biotinyliertem Heparin (20 µg/mL) unter Kontrolle der Biacore-Steuerungssoftware mit einer Flussrate von 20 µL/min.

**Tabelle 3.9-4:** Arbeitsvorschrift der Immobilisierung von Heparin-Biotin am Sensorchip SA

Arbeitsschritte										
Material	Sensorchip SA (Biacore AB, Uppsala, Schweden), 50 nm Dextranmatrix, Streptavidin-konjugiert Heparin-Biotin (Calbiochem, Merck Biosciences) intestinal mucosa ( <i>porcine</i> ), MW 15 kDa ( <i>avg.</i> ), 5-8 mol % Biotin, biotinyliert über einen 12-Atom-spacer									
Immobilisierung	<table border="1"> <tbody> <tr> <td>1. Vorbereiten</td> <td>3 x 10 µL Injektion, 50 mM NaOH, 1 M NaCl</td> <td>10 µL/min</td> </tr> <tr> <td>2. Konjugation</td> <td>1 x 60 µL Injektion, Heparin-Biotin in Puffer A, 20 µg/mL</td> <td>10 µL/min</td> </tr> <tr> <td>3. Waschen</td> <td>3 x 10 µL Injektion, Puffer B</td> <td>10 µL/min</td> </tr> </tbody> </table>	1. Vorbereiten	3 x 10 µL Injektion, 50 mM NaOH, 1 M NaCl	10 µL/min	2. Konjugation	1 x 60 µL Injektion, Heparin-Biotin in Puffer A, 20 µg/mL	10 µL/min	3. Waschen	3 x 10 µL Injektion, Puffer B	10 µL/min
1. Vorbereiten	3 x 10 µL Injektion, 50 mM NaOH, 1 M NaCl	10 µL/min								
2. Konjugation	1 x 60 µL Injektion, Heparin-Biotin in Puffer A, 20 µg/mL	10 µL/min								
3. Waschen	3 x 10 µL Injektion, Puffer B	10 µL/min								
Puffersystem										
Puffer A	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) Tween 20, 3 mM EDTA, pH 7,4									
Puffer B	10 mM HEPES, 2 M NaCl, 0.005% (v/v) Tween 20, 3 mM EDTA, pH 7,4									

<sup>1</sup> Wilchek & Bayer, 1988; Della-Penna *et al.*, 1986

### 3.9.4.2 Bindung der Analyten an einem Heparin-modifizierten Biochip

Die Aufnahme von Bindungskurven am Biacore® 3000 System erfolgte computergesteuert in Form von programmierten Messreihen, um reproduzierbare Versuchsabläufe zu gewährleisten. Die verwendeten Puffersysteme basierten auf Milli-Q®-Reinstwasser, wurden autoklaviert, sterilfiltriert (0,2 µm Einwegfilter, Sartolab P, Sartorius) und bei 4 °C gelagert. Um bei den Messungen einen störenden Einfluss von Fremdionen auszuschließen, wurden die Puffersysteme zuvor mit Chelex®100 (Sigma) behandelt.

Eine Messung auf einem Biochip erfolgt immer auf einer Referenz- sowie einer Messzelle. Die unspezifische Bindung eines Analyten an der Referenzoberfläche wird von den Daten der Messzelle abgezogen. Durch diese Vorgehensweise erhaltene Sensorgramme bestehen allgemein aus einer Injektions- und Dissoziationsphase. Diese sind durch ein schnelles Ansteigen des Messsignals bis zu einem Gleichgewichtszustand, bzw. einem Abfallen des Messsignals gekennzeichnet. In dieser Arbeit betragen die Messzeiten für die Injektions- und Dissoziationsphase jeweils fünf Minuten. Danach wurde die Regeneration des Sensorchips vorgenommen, um noch auf der Sensoroberfläche gebundenen Analyten zu entfernen. Die Regenerationslösung sollte den immobilisierten Liganden nicht beeinflussen, um den Biochip unter vergleichbaren Bedingungen mehrfach verwenden zu können.

In dieser Arbeit wurde die Bindung der Serpine HCII und ATIII an einem Heparin-konjugierten Biochip unter verschiedenen Pufferbedingungen untersucht. Die Art und Durchführung der Messungen war gleichbleibend und ist in Tabelle 3.9-5 wiedergegeben.

**Tabelle 3.9-5:** Arbeitsvorschrift der Messungen auf einem Heparin-modifizierten Biochip

Arbeitsschritte			
Material	Heparin-modifizierter Sensorchip SA (3.9.4.1) gereinigtes HCII aus humanem Plasma (3.6) ATIII aus humanem Plasma (Roche Diagnostics)		
Messung	1. Äquilibration	kontinuierlicher Pufferstrom, Puffer A	20 µL/min
	2. Analyt-Injektion	100 µL HCII oder ATIII in Puffer B, Konzentrationen: 0,04 - 3 µM	20 µL/min
	3. Dissoziation	100 µL Puffer A	20 µL/min
	4. Regeneration	3 x 10 µL Injektion, 50 mM HEPES, 2 M NaCl, pH 9,5	20 µL/min
Puffersystem			
	Puffer A	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) Tween 20, pH 7,4	
	Puffer B	10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) Tween 20, pH 7,4 Entsprechend den Versuchsbedingungen konnten dem Puffersystem verschiedene Konzentrationen an unterschiedlichen Ionen zugefügt sein.	

### 3.9.5 Anregungs-Emissionspektroskopie (AES)

Strukturelle Untersuchungen an Biomolekülen werden häufig durch NMR- und Röntgenstrukturmethode vorgenommen. Auch wenn diese Techniken gut geeignet sind um den Aufbau eines Moleküls darzustellen, sind diese statischen Methoden aber kaum in der Lage, die Veränderung der Struktur von Proteinen oder Peptiden bei deren Interaktion mit anderen Substanzen und Kofaktoren wiederzugeben. Auch ist es mit diesen Methoden nicht möglich Informationen über die Konformationsänderung unter annähernd physiologischen Bedingungen zu erhalten. Neben der CD-Spektrometrie ist die Fluoreszenzspektroskopie eine geeignete Methode um Konformationsprozesse an biologischen Molekülen zu detektieren. Die Vorteile von fluoreszenzspektroskopischen Untersuchungen liegen in der störungsfreien Durchführung, da Proteine und Peptide bereits über intrinsische Fluorophore verfügen und eine zusätzliche Modifizierung der Biomoleküle durch extrinsische Fluorophore nicht zwingend notwendig ist. Diese intrinsischen Fluorophore werden durch Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan gestellt, wobei die Fluoreszenz vom Tryptophan meist dominiert. Tyrosin erfährt zum Teil eine Fluoreszenzlöschung durch das Lösungsmittel, vor allem aber durch einen Transfer seiner Fluoreszenzenergie zum Tryptophan<sup>1</sup>. Veränderungen der Tyrosin-fluoreszenz können bei der Strukturaufklärung hilfreich sein, da sie durch den geänderten Transfer der Fluoreszenzenergie auf eine Konformationsänderung am Protein hindeuten. Das Emissionsmaximum der Tryptophanfluoreszenz ist ein Indiz für die Lage der Aminosäure im Protein. Tryptophanreste, welche sich an der Proteinoberfläche in polarer wässriger Umgebung befinden, haben ein Fluoreszenzmaximum bei ca. 353 nm. Hingegen verschiebt sich dieses Maximum zu größeren Wellenlängen, wenn der Tryptophanrest sich im hydrophoben Proteininneren befindet.

**Tabelle 3.9-6:** Absorptions- und Fluoreszenzmerkmale der fluorophoren Aminosäuren<sup>2,3</sup>

	Phenylalanin	Tyrosin	Tryptophan
Durchschnittliches Vorkommen in Proteinen (%)	3,5	3,5	1,1
Absorptionsmaximum (nm)	257	274	280
Absorptionskoeffizient ( $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ )	200	1400	5600
Emissionsmaximum (nm)	282	303	353
Quantenausbeute im Protein	0,00	0,02	0,47

Absorptions- und Fluoreszenzcharakteristika der drei aromatischen Aminosäuren in Wasser bei pH 7,0

<sup>1</sup> Lakowicz, 1992

<sup>2</sup> Winter & Noll, 1998

<sup>3</sup> Plessow, 2003

### 3.9.5.1 Aufbau des AES-Detektionssystems

Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen wurden im Arbeitskreis „Physikalische Chemie 1“ der Universität Bielefeld vorgenommen. Die zur Anregungs-Emissionsspektroskopie verwendete Apparatur besteht aus einer Xenon-Lampe, einem Anregungsmonochromator zur Wellenlängenselektion, einer temperierbaren Probenhalterung, einem Nachweismonochromator und einer CCD-Kamera als Detektionseinheit. Das Anregungslicht wird durch eine 75 Watt Xenon-Bogenlampe, in einem Wellenlängenbereich von 200 bis 650 nm als kontinuierliches Spektrum erzeugt. Das Licht wird über zwei Sammellinsen auf den Eingangsspalt des Anregungsmonochromators abgebildet. Das Anregungslicht wird über eine Spiegellogik aus zwei Hohlspiegeln auf die Probe fokussiert. Die Probe selbst befindet sich in einer Küvette in einem über drei Achsen justierbaren Probenhalter. Als Küvetten werden Suprasil<sup>®</sup> Präzisionsküvetten (Typ 111-QS, 10 x 10 mm<sup>2</sup>, Hellma, Müllheim) eingesetzt. Das emittierte Licht wird rechtwinklig zum eintretenden Lichtstrahl über Hohl- und Zylinderspiegel auf den Nachweismonochromator geleitet und von der CCD-Kamera detektiert. Diese ermöglicht die Erfassung von Wellenlängen im Bereich von 200 bis 1100 nm. Die Daten werden über das Programm WinSpec (Roper Scientific) aufgenommen und mit weiterer Software nachbearbeitet und ausgewertet. Zur Nachbearbeitung wurde von den Rohdaten sowohl das Dunkelbild (Messung ohne Anregungslicht) als auch das Bild des Lösungsmittels subtrahiert. Detailliertere Informationen zur AES-Spektroskopie und zum experimentellen Aufbau sind anderen Quellen zu entnehmen<sup>1</sup>.

### 3.9.5.2 Messung der intrinsischen Fluoreszenz von HCII und ATIII

In dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung von zweiwertigen Kationen der Übergangsmetallgruppe mit HCII untersucht werden. Dabei sollten die strukturellen Änderungen am Protein infolge möglicher Bindung von Kationen mit Hilfe fluoreszenzspektroskopischer Messungen charakterisiert werden. Um bei den Messungen einen störenden Einfluss von Fremdionen auszuschließen, wurden die Puffersysteme zuvor mit Chelex<sup>®</sup>100 (Sigma) behandelt und Partikel durch Filtration (0,2 µm, Minisart<sup>®</sup> Plus, Sartorius) entfernt. Die Durchführung wurde an dem beschriebenen Fluoreszenzspektroskop (3.9.5.1) bei 20 °C vorgenommen. Die Detektion des Anregungs-Emissionsspektrums erfolgte in Form von zweidimensionalen Fluoreszenzbildern in einem Anregungsbereich ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) zwischen 240 und 350 nm und einem Emissionsbereich des fluoreszenten Lichtes ( $\lambda_{\text{em}}$ ) zwischen 240 und 500 nm. Die Auswertung der Emissionsspektren erfolgte bei der maximalen Anregungswellenlänge von 280 nm.

---

<sup>1</sup> Brockhinke *et al.*, 2000; Plessow, 2003

**Tabelle 3.9-7:** Bedingungen der intrinsischen Fluoreszenzmessung

Proteine	gereinigtes HCII aus humanem Plasma (3.6), 11 $\mu\text{M}$ in Puffer A ATIII aus humanem Plasma (Roche Diagnostics), 4 $\mu\text{M}$ in Puffer A
Heparin	Heparin (Sigma) intestinal mucosa ( <i>porcine</i> ), MW 15 kDa ( <i>avg.</i> ), 15 $\mu\text{M}$
Kationen	ZnCl <sub>2</sub> , MnCl <sub>2</sub> , NiCl <sub>2</sub> , CaCl <sub>2</sub> In Konzentrationen von 1 mM
Puffer A	30 mM HEPES, 130 mM NaCl, pH 7,4

200  $\mu\text{L}$  HCII (11  $\mu\text{M}$ ) oder ATIII (4  $\mu\text{M}$ ) wurden in der Küvette vorgelegt und die relative Änderung des Emissionsspektrums bei Zugabe von verschiedenen Kationen oder Heparin registriert. Die Wechselwirkung zwischen HCII und Zink-Kationen wurde durch Auswertung der Emissionsspektren von HCII bei verschiedenen Zinkkonzentrationen quantifiziert. Verdünnungseffekte bei der  $\text{Zn}^{2+}$ -Titration von HCII wurden bei der Berechnung einer Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) berücksichtigt und für die HCII•Zink-Assoziation eine äquimolare Stöchiometrie angenommen. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten basiert auf der Bildung eines spezifischen, reversiblen Komplexes aus HCII und Zinkionen, wobei die Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) als Verhältnis von Dissoziationsgeschwindigkeit zu Assoziationsgeschwindigkeit definiert ist. Entsprechend gilt:

$$[\text{HCII}] \cdot [\text{Zn}^{2+}] = K_d \cdot [\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}] \quad (1)$$

$$[\text{HCII}] = [\text{HCII}]_0 - [\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}] \quad [\text{Zn}^{2+}] = [\text{Zn}^{2+}]_0 - [\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}] \quad (2)$$

$$([\text{HCII}]_0 - [\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}]) \cdot ([\text{Zn}^{2+}]_0 - [\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}]) = K_d \cdot [\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}] \quad (3)$$

Lösung der quadratischen Gleichung nach  $[\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}]$  führt zu Gleichung (4):

$$[\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ ([\text{HCII}]_0 + [\text{Zn}^{2+}]_0 + K_d) - \sqrt{([\text{HCII}]_0 + [\text{Zn}^{2+}]_0 + K_d)^2 - 4 \cdot [\text{HCII}]_0 \cdot [\text{Zn}^{2+}]_0} \right\} \quad (4)$$

Bei den Emissionsspektren setzt sich die Gesamtfluoreszenz ( $I$ ) aus den Fluoreszenzbeträgen der in der Probe enthaltenen Komponenten zusammen:

$$I = i_1 \cdot [\text{HCII}] + i_2 \cdot [\text{Zn}^{2+}] + i_3 \cdot [\text{HCII} \bullet \text{Zn}^{2+}] \quad (5)$$

Die Koeffizienten  $i_1$ ,  $i_2$  und  $i_3$  bezeichnen Konstanten für die Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Komponenten. Die Kombination der Gleichungen (5) und (2) führen zu Gleichung (6).

$$I = i_1 \cdot ([HCII]_0 - [HCII \cdot Zn^{2+}]) + i_2 \cdot ([Zn^{2+}]_0 - [HCII \cdot Zn^{2+}]) + i_3 \cdot [HCII \cdot Zn^{2+}]$$

$$I = i_1 \cdot [HCII]_0 + i_2 \cdot [Zn^{2+}]_0 + (i_3 - i_1 - i_2) \cdot [HCII \cdot Zn^{2+}] \quad (6)$$

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen setzt sich die Gesamtfluoreszenz nur aus der Fluoreszenz des HCII und des HCII•Zink-Komplexes zusammen, da Zinkionen selbst keine Fluoreszenz aufweisen.

$$I = i_1 \cdot [HCII]_0 + (i_3 - i_1 - i_2) \cdot [HCII \cdot Zn^{2+}] \quad (7)$$

$i_1 \cdot [HCII]_0$  steht für die Fluoreszenz vor Beginn der Titration:  $I_0 = i_1 \cdot [HCII]_0$ . Division von Gleichung (7) durch  $I_0$  führt zu Gleichung (8).

$$\frac{I}{I_0} = 1 + \frac{(i_3 - i_1 - i_2)}{i_1} \cdot \frac{[HCII \cdot Zn^{2+}]}{[HCII]_0} \quad (8)$$

Durch Umstellung nach  $[HCII \cdot Zn^{2+}]$  und mit  $\alpha = (i_3 - i_1 - i_2)/i_1$  erhält man:

$$\left( \frac{I}{I_0} - 1 \right) \cdot \frac{[HCII]_0}{\alpha} = [HCII \cdot Zn^{2+}] \quad (9)$$

Die Kombination von Gleichung (9) und (4) führt zu Gleichung (10).

$$\frac{I}{I_0} = \frac{\alpha}{2} \cdot \left\{ \left( 1 + \frac{[Zn^{2+}]_0 + K_d}{[HCII]_0} \right) - \sqrt{\left( 1 + \frac{[Zn^{2+}]_0 + K_d}{[HCII]_0} \right)^2 - 4 \cdot \frac{[Zn^{2+}]_0}{[HCII]_0}} \right\} + 1 \quad (10)$$

Gleichung (10) beschreibt einen Zusammenhang zwischen dem Beitrag des gebundenen Kations an der Fluoreszenz ( $I$ ) in Bezug auf die Konzentration des gesamten Kations ( $[Zn^{2+}]_0$ )<sup>1</sup>. Die Parameter in Gleichung (10),  $\alpha$  und die Dissoziationskonstante  $K_d$ , lassen sich durch „nicht lineare Regression“ ermitteln. Diese wurde mit Hilfe des Programms TableCurve 2D<sup>®</sup> (Version 5.01, SYSTAT Software) unter Verwendung von Gleichung (10) vorgenommen.

<sup>1</sup> Fredenburgh *et al.*, 1997; Boskovic *et al.*, 1990

### 3.9.6 Bestimmung von Reaktionskinetiken zweiter Ordnung

Die irreversible Komplexierungsreaktion zwischen HCII und einer Serinprotease ( $[T]$ ,  $\alpha$ -Thrombin oder  $\alpha$ -Chymotrypsin) entspricht einer Reaktionskinetik zweiter Ordnung. Dabei ist die Reaktionsgeschwindigkeit abhängig von der Konzentration beider Reaktanden. Über die Reaktionszeit  $t$  verringert sich die Konzentration der beiden Reaktanden in Abhängigkeit ihrer Ausgangskonzentrationen und der Reaktionskonstante  $k_2$ .

$$-\frac{d[T]}{dt} = k_2 \cdot [T] \cdot [HCII] \quad (1)$$

Die Konzentrationsänderungen zweier Komponenten im zeitlichen Verlauf einer Reaktion sind experimentell nur schwer zu detektieren. Die Isolationsmethode umgeht dieses Problem, indem die Konzentration eines der Reaktanden als unveränderliche Größe angesehen wird. Dies wird dadurch erreicht, dass ein Reaktand in großem Überschuss eingesetzt wird. Dessen Konzentration bleibt somit im Verlauf der Reaktion nahezu konstant. Die Konzentration wird in die Geschwindigkeitskonstante integriert  $k' = k_2 \cdot [HCII]_0$  und führt zum vereinfachten Geschwindigkeitsgesetz pseudo-erster Ordnung.

$$-\frac{d[T]}{dt} = k' \cdot [T] \quad (2)$$

$$\ln \frac{[T]_t}{[T]_0} = -k' \cdot t \quad (3)$$

Die Konzentration der Serinprotease  $[T]_t$  zu definierten Zeitpunkten  $t$  der Komplexierungsreaktion wird nicht direkt bestimmt, sondern indirekt durch die Aktivität der freien Protease gegenüber spezifischen chromogenen Substraten. Die enzymatische Spaltung dieses Substrates durch die Protease setzt als Produkt *p*-Nitroanilin frei, dessen Bildung bei 405 nm verfolgt werden kann. Die Bildungsgeschwindigkeit des Produktes ( $[\Delta A/\text{min}]$ ) ist direkt proportional zur Konzentration an nicht komplexierter, freier Serinprotease.

$$\ln \frac{[T]_t}{[T]_0} = \ln \frac{[\Delta A/\text{min}]_t}{[\Delta A/\text{min}]_0} = -k' \cdot t \quad (4)$$

Wird der natürliche Logarithmus  $\ln [\Delta A/\text{min}]_t / [\Delta A/\text{min}]_0$  verschiedener Komplexierungen gegen deren Komplexierungszeiten  $t$  aufgetragen, erhält man bei linearer Regression eine Gerade mit der Steigung  $k'$ , aus der mittels  $k_2 = k' / [HCII]_0$  die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung zu berechnen ist <sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Ciaccia *et al.*, 1997; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Blinder & Tollefsen, 1990

### 3.9.6.1 Kinetische Bestimmung der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin

Die Bestimmung der Reaktionskonstante zweiter Ordnung der Inhibierungsreaktion mit  $\alpha$ -Thrombin erfolgte mit den gereinigten rekombinanten HCII-Varianten aus CHO-Zellkulturen (3.8). Die  $\alpha$ -Thrombininhibierung wurde in Gegenwart der Glykosaminoglykane Heparin und Dermatansulfat vorgenommen, sowie unter deren Abwesenheit. Als Puffersystem und Lösungsmittel aller beteiligten Komponenten wurde TS/PEG verwendet, da das enthaltene Polyethylenglykol die Adhäsion von  $\alpha$ -Thrombin an Gefäßwandungen minimiert.

**Tabelle 3.9-8:** Bedingungen der rHCII/ $\alpha$ -Thrombin-Kinetik

Komplexierungsansatz	10 $\mu$ L Heparinlösung, Dermatansulfatlösung oder TS/PEG 40 $\mu$ L HCII-Lösung 50 $\mu$ L Thrombinlösung	Komplexierungszeit zwischen 10 Sekunden und 120 Minuten, RT
	Zugabe von 500 $\mu$ L Substratlösung	Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm für 60 Sekunden
Lösungen		
HCII-Lösung	gereinigtes rHCII (3.8) in TS/PEG, 125 nM	
Thrombinlösung	$\alpha$ -Thrombin aus humanem Plasma (Sigma) in TS/PEG, 10 nM	
Heparinlösung	Heparin (Sigma) intestinal mucosa ( <i>porcine</i> ), MW 15 kDa (avg.) in TS/PEG, 100 U/mL	
Dermatansulfatlösung	Chondroitinsulfat B (Sigma) intestinal mucosa ( <i>porcine</i> ), MW 42 kDa (avg.) in TS/PEG, 1000 $\mu$ g/mL	
Substratlösung	Chromozym TH ( <i>N-p</i> -Tosyl-Gly-Pro-Arg- <i>p</i> -nitroanilid, Roche Diagnostics) in TS/PEG, 150 $\mu$ M	
TS/PEG Puffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4	

Der Einfluss eines disulfidverbrückten N-Terminus von HCII auf die Reaktionsgeschwindigkeit sollte bei einigen der konstruierten rHCII-Varianten untersucht werden. Daher wurden die rHCII-Varianten neben ihrer nativen, oxidierten Form auch mit nicht fixiertem N-Terminus hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber  $\alpha$ -Thrombin untersucht. Die rHCII-Varianten wurden reduziert und alkyliert (siehe 3.4.4) und in gleicher Weise wie die nativen Formen in einer Komplexierungsreaktion verwendet.

Die Komponenten des Komplexierungsansatzes (100  $\mu$ L) wurden zusammengefügt und durch pipettieren gemischt. Die Endkonzentrationen der rHCII-Varianten und von  $\alpha$ -Thrombin betragen 50 nM bzw. 5 nM und erfüllten damit die Voraussetzung der im vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung. Die Komplexierungsreaktion wurde durch die Zugabe der  $\alpha$ -Thrombinlösung initiiert und nach variablen Zeitintervallen durch Zugabe des Substrates Chromozym TH (500  $\mu$ L, 150  $\mu$ M) gestoppt. Die Komplexierungsdauer war abhängig von der eingesetzten rHCII-Variante und dem verwendeten Glykosaminoglykan, war aber stets kleiner als drei Minuten. Im Gegensatz dazu

betrug die Komplexierungsdauer in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen wenigstens 60 Minuten. Die Konzentration des verbleibenden  $\alpha$ -Thrombins wurde indirekt durch dessen enzymatische Aktivität gegenüber dem Substrat Chromozym TH bestimmt. Die Bildung des Produktes *p*-Nitroanilin pro Zeiteinheit war dabei proportional zur Konzentration an nicht komplexiertem  $\alpha$ -Thrombin. Die Komplexierung und Bestimmung der Restaktivität von  $\alpha$ -Thrombin fand in Polystyren-Halbmikroküvetten statt. Die Bildung von *p*-Nitroanilin wurde bei 405 nm Wellenlänge in einem UV-Spektrometer (UV-1602, Shimadzu) verfolgt. Die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$  wurde durch die zuvor beschriebene Methodik vorgenommen.

### **3.9.6.2 Kinetische Bestimmung der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart bivalenter Kationen**

Die Untersuchung des Einflusses von Zinkionen auf die Reaktionskinetik der  $\alpha$ -Thrombin-Komplexierung durch HCII war ein Teilaspekt der vorliegenden Arbeit. Zur Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit der HCII/ $\alpha$ -Thrombin Wechselwirkung wurde gereinigtes HCII aus humanem Plasma verwendet (3.6). In analoger Weise wurden Komplexierungsuntersuchungen mit dem Serpin Antithrombin III (ATIII) aus humanem Plasma (Roche Diagnostics) vorgenommen. Die Kontrollexperimente mit diesem Serpin dienten dazu, die Ergebnisse des Einflusses von Zinkionen auf die Reaktionskinetik von HCII näher zu charakterisieren. Die Komplexierung wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von 2 U/ml Heparin vorgenommen. Die Vorgehensweise bei der Ermittlung der Reaktionskonstante entsprach im wesentlichen der unter 3.9.6.1 beschriebenen Methode. Um die spezifische Abhängigkeit des beobachteten Effektes von der Art des Kations zu demonstrieren, wurden des Weiteren Kalziumionen bei Komplexierungsuntersuchungen eingesetzt. Der Einfluss von Zinkionen auf die Reaktionskinetik wurde bei Konzentrationen von 5 bis 150  $\mu$ M untersucht. Kalziumionen wurden in Konzentrationen von 1 mM eingesetzt, da dies den physiologischen Konzentrationen dieser Ionen eher entspricht. Die Stammlösungen der Metallsalze wurden in Milli-Q<sup>®</sup>-Wasser erstellt, da in gepufferten Systemen die Kationen bei höheren Konzentrationen zur Bildung von unlöslichen Hydroxiden neigten.

**Tabelle 3.9-9:** Bedingungen der HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Kinetik in Gegenwart bivalenter Kationen

Komplexierungsansatz	5 $\mu$ L Heparinlösung oder TS/PEG 5 $\mu$ L Kationenlösung oder TS/PEG 40 $\mu$ L HCII-Lösung oder ATIII-Lösung 50 $\mu$ L Thrombinlösung	Komplexierungszeit zwischen 10 Sekunden und 90 Minuten
	Zugabe von 500 $\mu$ L Substratlösung	Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm für 60 Sekunden
Lösungen		
HCII-Lösung	gereinigtes HCII aus humanem Plasma (3.6) in TS/PEG, 250 nM	
ATIII-Lösung	ATIII aus humanem Plasma (Roche Diagnostics) in TS/PEG, 250 nM	
Thrombinlösung	$\alpha$ -Thrombin aus humanem Plasma (Sigma) in TS/PEG, 20 nM	
Heparinlösung	Heparin (Sigma, 175 Units/mg) intestinal mucosa ( <i>porcine</i> ), MW 15 kDa ( <i>avg.</i> ) in TS/PEG, 40 U/mL	
Kationenlösung	ZnCl <sub>2</sub> in Milli-Q <sup>®</sup> , 0,1 - 3 mM CaCl <sub>2</sub> in Milli-Q <sup>®</sup> , 20 mM	
Substratlösung	Chromozym TH ( <i>N-p</i> -Tosyl-Gly-Pro-Arg- <i>p</i> -nitroanilid, Roche Diagnostics) in TS/PEG, 150 $\mu$ M	
TS/PEG Puffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4	

### 3.9.7 Kinetische Bestimmung der Hemmung von $\alpha$ -Chymotrypsin

Die Versuche zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung  $k_2$  der  $\alpha$ -Chymotrypsininhibierung durch HCII wurden mit den gereinigten, rekombinanten HCII-Varianten aus CHO-Zellkulturen (3.8) vorgenommen. Die Versuchsdurchführung und Methodik erfolgte entsprechend einer Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung wie in vorangegangenen Abschnitt (3.9.6) detailliert beschrieben. Änderungen betrafen nur die verwendeten Reagenzien. Zur Komplexierung wurde die Serinprotease  $\alpha$ -Chymotrypsin verwendet, deren Aktivität mit dem Substrat *N*-Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilid (Sigma) bestimmt wurde. Der Komplexierungsansatz (100  $\mu$ L) enthielt die beiden Reaktionspartner rHCII (125 nM) und  $\alpha$ -Chymotrypsin (25 nM), sowie TLCK (*N* <sub>$\alpha$</sub> -Tosyl-L-lysin-chloromethylketon, L-1-Chloro-3-(4-tosylamido)-7-amino-2-heptanone, Fluka). TLCK dient der Inaktivierung von Trypsin, welches in  $\alpha$ -Chymotrypsinpräparationen häufig in Spuren enthalten ist. Die Komplexierungszeiten variierten zwischen 5 und 30 Minuten. Die Komplexierungsreaktion wurde bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt und durch Zufügen des Substrates (500  $\mu$ L, 150  $\mu$ M) beendet. Die Aktivitätsbestimmung des restlichen unkomplexierten  $\alpha$ -Chymotrypsins erfolgte durch die Detektion der Bildung von *p*-Nitroanilin bei 405 nm Wellenlänge im UV-Spektrometer.

**Tabelle 3.9-10:** Bedingungen der rHCII/ $\alpha$ -Chymotrypsin-Kinetik

Komplexierungsansatz	50 $\mu$ L HCII-Lösung 40 $\mu$ L Chymotrypsinlösung 10 $\mu$ L TLCK-Lösung	Komplexierungszeit zwischen 5 und 30 Minuten
	Zugabe von 500 $\mu$ L Substratlösung	Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm für 60 Sekunden
Lösungen		
HCII-Lösung	gereinigtes rHCII (3.8) in TS/PEG, 250 nM	
Chymotrypsinlösung	humanes $\alpha$ -Chymotrypsin ( <i>pancreas</i> , Sigma) in TS/PEG, 62,5 nM	
TLCK-Lösung	$N_{\alpha}$ -Tosyl-L-lysin-chloromethylketon (Fluka), in TS/PEG, 62,5 nM	
Substratlösung	<i>N</i> -Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilid (Sigma) in TS/PEG, 150 $\mu$ M	
TS/PEG Puffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4	

### 3.9.8 Bestimmung der operativen Molarität von $\alpha$ -Thrombinlösungen

Kinetische Charakterisierungen von Enzymen und Untersuchungen ihrer katalytischen Eigenschaften erfordern in einigen Fällen die Kenntnis der Molarität an operativen, funktionellen Reaktionsstellen der Enzyme. Die Titration von Enzymen durch *active site titration* ist eine Methode zur Quantifizierung des reaktiven Anteils in Enzympräparationen, welche zuerst von Bender *et al.*<sup>1</sup> beschrieben wurde. Gute Titranten bilden feste Acyl-Enzym-Intermediate und führen zur Inaktivierung des Enzyms. Die Titranten sollten gut charakterisiert, unter den Versuchsbedingungen chemisch stabil sein, einen stöchiometrischen 1:1 Komplex mit der Protease bilden und nur mit deren aktiven Zentrum reagieren<sup>2</sup>. Der in dieser Arbeit verwendete Thrombininhibitor PPACK (*H-D*-Phe-Pro-Arg-Chloromethylketon, Bachem) ist ein irreversibler Hemmstoff mit entsprechend starker Bindung an die Protease, der sich aber auch als *tight-binding*-Inhibitor beschreiben lässt. Der Hemmstoff bildet kovalente Bindungen zum Serin als auch zum Histidin der katalytischen Triade von  $\alpha$ -Thrombin. Folglich inaktiviert der Inhibitor das Enzym nahezu vollständig. Eine Anwendung der *tight-binding*-Kinetik ist trotzdem möglich, auch wenn diese von einem reversiblen Reaktionsmechanismus ausgeht. Bei der *tight-binding*-Titrationskinetik ist die Ermittlung der aktiven Enzymkonzentration besonders verlässlich, wenn die Konzentration des Inhibitors kleiner ist als die des Enzyms und mehr als 98 % des zugefügten Inhibitors als Komplex vorliegt, was bei einem irreversiblen Inhibitor erfüllt ist<sup>3</sup>. Eine Bestimmung des  $K_i$ -Wertes ist unter gleichen Bedingungen aber nicht sinnvoll. Die Reaktion zwischen den Reaktanden  $\alpha$ -Thrombin [*T*] und PPACK [*CMK*] kann in folgender einfacher Form dargestellt werden.

<sup>1</sup> Bender *et al.*, 1965; Bender *et al.*, 1966; Bender *et al.*, 1967; Elmore & Smyth, 1968

<sup>2</sup> Brocklehurst *et al.*, 2001

<sup>3</sup> Kuzmic *et al.*, 2000; Murphy, 2004

$$[T] \cdot [CMK] = K_i \cdot [T \bullet CMK] \quad (1)$$

Die Konzentrationen der Reaktanden lassen sich beschreiben durch:

$$[T] = [T]_0 - [T \bullet CMK] \quad [CMK] = [CMK]_0 - [T \bullet CMK] \quad (2)$$

wobei  $[T]_0$  und  $[CMK]_0$  für die Anfangskonzentrationen (Totalkonzentrationen) der Reaktanden stehen. Somit kann Gleichung (1) auch dargestellt werden als:

$$([T]_0 - [T \bullet CMK]) \cdot ([CMK]_0 - [T \bullet CMK]) = K_i \cdot [T \bullet CMK] \quad (3)$$

Lösung der quadratischen Gleichung nach  $[T \bullet CMK]$  führt zu Gleichung (4)<sup>1</sup>:

$$[T \bullet CMK] = \frac{1}{2} \cdot \left\{ ([T]_0 + [CMK]_0 + K_i) - \sqrt{([T]_0 + [CMK]_0 + K_i)^2 - 4 \cdot [T]_0 \cdot [CMK]_0} \right\} \quad (4)$$

In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der *active site*-Konzentration des Enzyms durch Inhibierung eines Anteils der Protease durch PPACK und Bestimmung der Restaktivität des nicht inaktivierten  $\alpha$ -Thrombins. Durch enzymatische Hydrolyse des Substrates Chromozym TH wurde *p*-Nitroanilin freigesetzt, welches durch Messung der Extinktion bei 405 nm Wellenlänge quantifiziert werden konnte. Die zu beobachtende Bildungsrate ( $\nu$ ) von *p*-Nitroanilin ist proportional zur Konzentration an  $\alpha$ -Thrombin  $[T]$ ,  $\nu = [T] \cdot (SA)$ . Dabei ist  $(SA)$  eine Konstante und entspricht der spezifischen Aktivität von  $\alpha$ -Thrombin gegenüber dem Substrat. Unter Einbeziehung von Gleichung (2) erhält man für Gleichung (4)<sup>2</sup>:

$$\nu = (SA) \left\langle [T]_0 - \frac{1}{2} \cdot \left\{ ([T]_0 + [CMK]_0 + K_i) - \sqrt{([T]_0 + [CMK]_0 + K_i)^2 - 4 \cdot [T]_0 \cdot [CMK]_0} \right\} \right\rangle \quad (5)$$

Die *active site*-Konzentration des Enzyms kann durch Analyse der Proteaseaktivität bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen bestimmt werden. Diese Methode der Enzymtitration basiert auf einen Plot der katalytischen Aktivität (als Ordinate) gegen die molare Konzentration des Titranten als Abszisse. Die Ermittlung der Enzymkonzentration erfolgte durch eine Anpassung der Gleichung (5) an die experimentellen Daten unter Einsatz des Programms ENZFITTER (Vers. 2.0.17.0, Biosoft, Cambridge, UK).

Die Durchführung zur Bestimmung der operativen Molarität von  $\alpha$ -Thrombinlösungen folgte in ähnlicher Weise wie die schon beschriebene Methode der Inaktivierung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII (3.9.6.1).  $\alpha$ -Thrombinlösungen (ca. 2 nM) wurden mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen des Inhibitors PPACK versetzt und bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert.

<sup>1</sup> Gutheil & Bachovchin, 1993

<sup>2</sup> Knight, 1995, Bieth, 1995

Nach Zugabe des Substrates Chromozym TH wurde in einem Zweistrahlphotometer (UV-1602, Shimadzu) die Menge an aktiven  $\alpha$ -Thrombin durch die Bildungsrate des *p*-Nitroanilins bestimmt. Die Auswertung erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Untersuchungen ergaben, dass 89-90 % des  $\alpha$ -Thrombins in der Lösung reaktiv waren.

**Tabelle 3.9-11:** Bedingungen der Bestimmung der operativen Molarität von  $\alpha$ -Thrombinlösungen

Komplexierungsansatz	10 $\mu$ L Thrombinlösung 10 $\mu$ L Puffer 80 $\mu$ L Inhibitorlösung	Komplexierungszeit 60 Minuten
	Zugabe von 500 $\mu$ L Substratlösung	Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm für 60 Sekunden
Lösungen		
Thrombinlösung	$\alpha$ -Thrombin aus humanem Plasma (Sigma) in TS/PEG, 20 nM	
Inhibitorlösung	PPACK (H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon, Bachem) in TS/PEG, (0,5 - 4 nM) Stammlösung: 10 mM in Milli-Q <sup>®</sup> -Wasser, -80 °C	
Substratlösung	Chromozym TH ( <i>N-p</i> -Tosyl-Gly-Pro-Arg- <i>p</i> -nitroanilid, Roche Diagnostics) in TS/PEG, 150 $\mu$ M	
TS/PEG Puffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4	

### 3.9.9 Bestimmung der Stöchiometrie der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin durch HCII

Neben der Geschwindigkeit einer Reaktion und ihrem Gleichgewicht sind auch die Verhältnisse der miteinander reagierenden Spezies von Bedeutung. Bei der klassischen Betrachtung der Stöchiometrie beschreibt diese die Anzahl an Molekülen einer jeden an einer Reaktion beteiligten Spezies. Bei der Inhibierung von Serinproteasen durch Serpine ist die Stöchiometrie vielmehr ein Maß, über welches sich das Verhältnis des inhibitorischen- und Substratpfades des *branched pathway*-Mechanismus der Serpine bestimmen lässt (Abbildung 2.1-4). Die Stöchiometrie der  $\alpha$ -Thrombinaktivierung durch HCII wurde sowohl für gereinigtes HCII aus humanem Plasma (3.6) als auch für die verschiedenen rekombinanten HCII-Varianten (3.8) bestimmt. Der Stöchiometrie-Index der Inhibition (SI) wurde in Gegenwart von Heparin und Dermatansulfat oder in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen bestimmt. Die Methode der SI-Bestimmung gleicht im wesentlichen den zuvor beschriebenen kinetischen Arbeitstechniken. Eine durch *active site*-Titration bestimmte  $\alpha$ -Thrombinkonzentration wurde mit variierenden Konzentrationen an HCII bei Raumtemperatur inkubiert. Der unkomplexierte Teil des  $\alpha$ -Thrombins wurde durch seine enzymatische Aktivität gegenüber dem Substat und der Bildungsrate von *p*-Nitroanilin detektiert. Durch einen Plot der  $\alpha$ -Thrombinaktivität (Ordinate) gegen das verwendete Inhibitor/Enzymverhältnis ( $[HCII]_0/[T]_0$ ) kann der SI-Wert aus dem Schnittpunkt einer

linearen Regression an der Abszisse identifiziert werden. Die SI-Bestimmung kann auch durch iterative Anpassung der experimentellen Daten an Gleichung (5) aus 3.9.8 erfolgen.

**Tabelle 3.9-12:** Bedingungen der Stöchiometriebestimmung von  $\alpha$ -Thrombin-Inhibierungsreaktionen

Komplexierungsansatz	10 $\mu$ L Thrombinlösung 10 $\mu$ L Glykosaminoglykanlösung oder Puffer 80 $\mu$ L HCII-Lösung	Komplexierungszeit zwischen 60 bis 90 Minuten
	Zugabe von 500 $\mu$ L Substratlösung	Messung der Extinktionsänderung bei 405 nm für 60 Sekunden
Lösungen		
Thrombinlösung	$\alpha$ -Thrombin aus humanem Plasma (Sigma) in TS/PEG, 20 nM	
HCII-Lösung	gereinigtes rHCII (3.8) in TS/PEG, 0,031-6,25 nM gereinigtes HCII aus humanem Plasma (3.6) in TS/PEG, 0,62-10 nM	
Heparinlösung	Heparin (Sigma) intestinal mucosa ( <i>porcine</i> ), MW 15 kDa ( <i>avg.</i> ) in TS/PEG, 100 U/mL	
Dermatansulfatlösung	Chondroitinsulfat B (Sigma) intestinal mucosa ( <i>porcine</i> ), MW 42 kDa ( <i>avg.</i> ) in TS/PEG, 1000 $\mu$ g/mL	
TS/PEG Puffer	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4	

# Kapitel 4

## Ergebnisse

Heparinkofaktor II (HCII) ist ein Mitglied der Serpinfamilie und unterscheidet sich durch einige besondere Charakteristika von anderen Serpinen. Gegenüber seiner Zielprotease  $\alpha$ -Thrombin besitzt HCII eine atypische Spaltstelle und der Mechanismus der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin erfolgt unter Beteiligung einer N-terminalen Domäne des HCII. Diese Hemmung wird durch polyanionische Glykosaminoglykane wie Heparin und Dermatan sulfat gefördert. Die genaue Lokalisation der N-terminalen Domäne sowie deren Struktur im nativen HCII-Molekül sind nicht genau bekannt.

Die vorliegende Arbeit beschreibt Untersuchungen am HCII bezüglich der Wechselwirkung mit Kofaktoren und die Bedeutung von Konformationsänderungen am HCII auf die Heparinaffinität und die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin. Das folgende Kapitel gliedert sich in zwei thematische Abschnitte. Zuerst wird die Isolierung von HCII aus humanem Plasma (4.1) beschrieben, wie auch die Heparininteraktion von HCII unter dem Einfluss von Zinkionen durch Verwendung von chromatographischen oder biosensorischen Methoden (4.2). Weiterhin wird die Fähigkeit von HCII zur Bindung von Zinkionen dargestellt (4.3) und der Einfluss beschrieben, den diese Ionen auf die Konformation von HCII (4.4) und auf die Reaktion mit  $\alpha$ -Thrombin ausüben (4.5).

Der zweite thematische Abschnitt stellt die Bedeutung der N-terminalen Domäne von HCII und deren Einfluss auf den Mechanismus der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin dar. Beschrieben wird die Herstellung von Affinitätsmatrices für die Reinigung von rekombinantem HCII (4.6), die Konstruktion von Expressionsplasmiden (4.7) für unterschiedliche HCII-Varianten und die Expression dieser Varianten in eukaryotischen Zellsystem sowie die Isolierung der exprimierten Proteine (4.8). Die Charakterisierung der rekombinanten HCII-Varianten hinsichtlich des Mechanismus der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin ist in den Abschnitten 4.9 und 4.10 beschrieben.

## **Einfluss von Zinkionen auf die Konformation von HCII und dessen Affinität zu Heparin**

### **4.1 Produktion von HCII aus humanem Plasma**

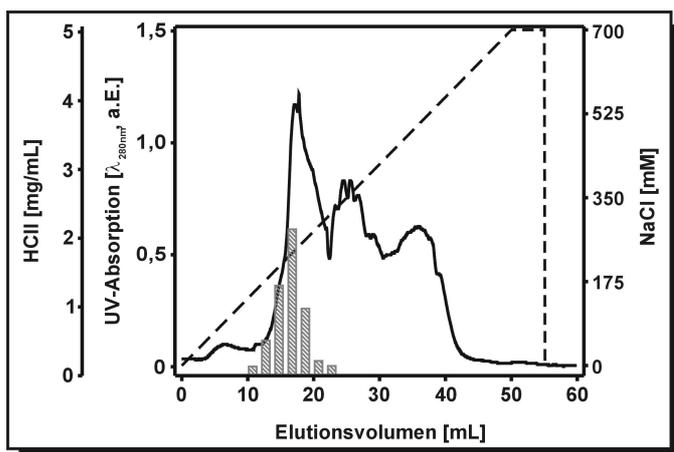
Die Untersuchungen am HCII bezüglich der Wechselwirkungen mit Kofaktoren und deren Einfluss auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin wurden mit HCII aus humanem Plasma durchgeführt.

#### **4.1.1 Isolierung und Reinigung**

Die Reinigung von HCII aus Plasma ist eine bekannte Methode und basiert auf einer Abfolge unterschiedlicher Trennungsschritte, welche fraktionierte Fällungen und chromatographische Trennungen beinhalten<sup>1</sup>, wie unter 3.6.1 beschrieben. Die Fällungsschritte dienen allgemein der groben Abreicherung von Fremdproteinen. Das verwendete Polyethylenglykol (PEG 8000) erlaubte es, Proteine zu präzipitieren ohne Denaturierungen zu verursachen. Durch den Einsatz von Bariumchlorid konnten Vitamin-K-abhängige Gerinnungsfaktoren (z.B. Faktor IX, Faktor X und Prothrombin) als Präzipitat aus dem Plasma entfernt werden. HCII wurde erst bei PEG-Konzentrationen über 200 g/L ausgefällt, zusammen mit weiteren Proteinen wie Albumin, Antithrombin III, Immunglobulinen und Transferrin. Zur Abreicherung von Kontaminanten wurde HCII mit chromatographischen Methoden weiter aufgearbeitet. Unter Verwendung einer Heparin-Sepharose-Chromatographie (siehe 3.6.2) konnten weitere Proteine aus dem Gemisch entfernt werden. Bei dieser Affinitätschromatographie wurde die spezifische Bindung von Proteinen an Heparin ausgenutzt. Die Elution von HCII erfolgte in einer Stufe mittels 0,2 M NaCl im Elutionspuffer. Unter diesen Bedingungen wurden mit HCII noch weitere Proteine koeluiert (s.u.), welche ebenfalls spezifisch an Heparin binden. Diese Proteine wurden mit Hilfe einer Anionentauscher-Chromatographie (siehe Tabelle 3.6-2) weiter abgereichert und vom HCII separiert. Neben der Entfernung von kontaminierenden Proteinen hatte die Anionentauscher-Chromatographie auch die Funktion einer Aufkonzentrierung des Zielproteins. Die Elution von der Ionentauschermatrix wurde durch einen Lineargradienten von 0 bis 0,7 M NaCl erreicht.

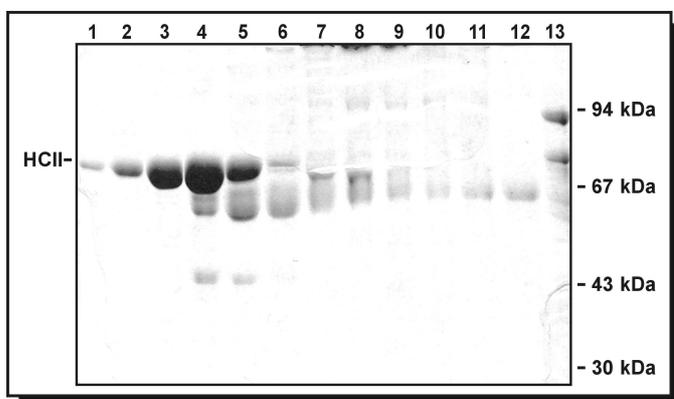
---

<sup>1</sup> Griffith *et al.*, 1985<sup>a</sup>; Zhang *et al.*, 1994; Böhme, 2001



**Abbildung 4.1-1:** Elutionsdiagramm einer Anionenauscher-Chromatographie (Mono Q<sup>®</sup> HR 5/5) von HCII aus humanem Plasma. Proteindetektion im Eluat durch Messung der UV-Absorption ( $\lambda = 280$  nm, a.E. = absolute Einheit). Die in den Eluatfraktionen enthaltenen HCII-Konzentrationen (Balken) wurden mit Hilfe eines ELISA (3.4.1.1) bestimmt.  
 --- NaCl-Konzentration  
 — UV-Absorption

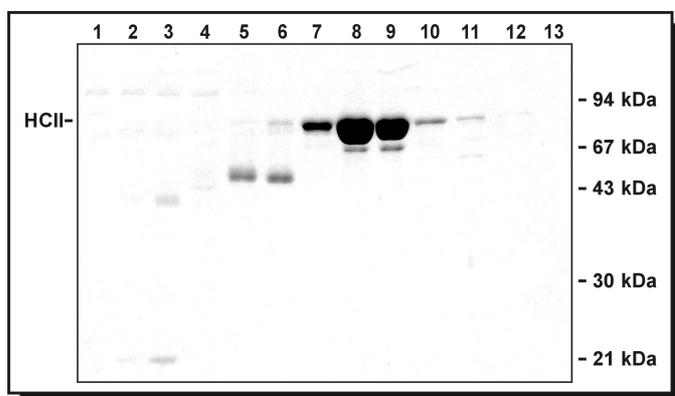
Wie in Abbildung 4.1-1 verdeutlicht, eluierte das gesamte HCII zwischen 10 und 25 mL des Elutionsvolumens bei 120 bis 340 mM NaCl. HCII stellte in diesem Elutionsbereich den Großteil des erhaltenden Proteins, war aber weiterhin mit anderen Proteinen verunreinigt (siehe Abbildung 4.1-2). Diese Kontaminationen wurden durch Proteine verursacht, die einen ähnlichen isoelektrischen Punkt (pI) wie HCII besitzen. Die Abbildung 4.1-2 zeigt in den Spuren 1-12 die Eluatfraktionen der Anionenauscher-Chromatographie, mit HCII in den Fraktionen 1 bis 6. In Spur 13 ist das Eluat der Heparin-Sepharose-Chromatographie aufgetragen. Der Vergleich mit den Spuren der Anionenauscher-Chromatographie zeigt den Erfolg dieser Reinigung.



**Abbildung 4.1-2:** SDS-PAGE (Tris/Glycin) und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung der Reinigung und Isolierung von HCII aus humanem Plasma. Spuren 1 bis 12: Eluatfraktionen einer FPLC<sup>®</sup>-Anionenauscher-Chromatographie (10 bis 40 mL Elutionsvolumen, siehe Abbildung 4.1-1). Spur 13: Eluat der Heparin-Sepharose-Chromatographie.

Für viele Anwendungen, bei denen HCII immunologisch detektiert wird, stellen die Fremdproteine kein Problem dar. Andere analytische Untersuchungen, welche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, benötigten eine höhere Reinheit der HCII-Präparation. Der in dieser Arbeit beschriebene Effekt der stärkeren Assoziation von HCII an Heparin in Gegenwart von Zinkionen (siehe 4.2.1) wurde zur weiteren Reinigung ausgenutzt (siehe Tabelle 3.6-2). Andere Methoden der Feinreinigung von Proteinen verwenden als letzten Reinigungsschritt häufig eine Gelfiltration (Ausschlusschromatographie), welche aber mit einer Verdünnung der Probe und mit Produktverlusten verbunden ist. Bei der Heparin-Sepharose-Chromatographie konnte mittels Zinkionen (50  $\mu$ M) im Puffersystem selektiv nur die Affinität von HCII zu Heparin erhöht werden, während die Affinitäten der

verunreinigenden Proteine unbeeinflusst blieben. Durch die erzielte höhere Bindungsstärke von HCII zu Heparin eluierte das Protein bei höheren NaCl-Konzentrationen und wurde auf diese Weise von den verunreinigenden Proteinen separiert.



**Abbildung 4.1-3:** SDS-PAGE (Tris/Glycin) und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung einer Heparin-Sepharose-Chromatographie. HCII enthaltende Fraktionen der vorherigen Anionenaustauscher-Chromatographie (Fraktionen 1-6, Abbildung 4.1-2) wurden vereinigt und einer FPLC<sup>®</sup>-Heparin-Sepharose-Chromatographie in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  unterzogen.

Das durch die Chromatographie in Gegenwart von Zinkionen erhaltene HCII aus Plasma wurde hauptsächlich in zwei Fraktionen eluiert (Spuren 8 und 9, Abbildung 4.1-3) und war nahezu frei von Proteinverunreinigungen. Die in den Spuren sichtbaren schmalen Banden unterhalb der Hauptbanden stellen Abbauprodukte von HCII dar, da diese Banden auch im Western-Blot durch Anti-HCII-Antikörper detektiert wurden (nicht gezeigt). HCII, welches in seinem reaktiven Zentrum gespalten ist, weist ein um ca. 6-8 kDa verringertes Molekulargewicht auf. Dieser Zerfall an der natürlichen Spaltstelle von HCII wurde bei den meisten Aufreinigungen beobachtet und nahm in der Regel mit der Anzahl an Reinigungsschritten zu. Das apparente Molekulargewicht von HCII betrug im SDS-Gel etwa 72 bis 74 kDa, in Übereinstimmung mit der Literatur<sup>1</sup>. Dieses apparente Molekulargewicht weicht vom tatsächlichen Molekulargewicht (65,5 kDa) des HCII aufgrund von posttranslationalen Modifikationen ab, welche die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins im SDS-Gels beeinflussen<sup>2</sup>.

Das hier dargestellte Ergebnis der Reinigung ist repräsentativ für mehrere durchgeführte HCII-Reinigungen aus humanem Plasma. Die Menge an HCII in den Eluaten der Anionenaustauscher-Chromatographie betrug 6 bis 8,2 mg bei einem ursprünglich eingesetzten Plasmavolumen von 300 mL (mit ca. 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  HCII)<sup>3</sup>, was einer Gesamtausbeute von 25-35 % entspricht. Die zusätzliche Reinigung unter Verwendung der Heparin-Sepharose-Chromatographie in Gegenwart von Zinkionen verringerte die Ausbeute auf 18-28 %.

<sup>1</sup> Tollefsen *et al.*, 1982 ; Griffith *et al.*, 1985<sup>a, b</sup>

<sup>2</sup> Böhme *et al.*, 2002

<sup>3</sup> Tollefsen & Pestka, 1985<sup>a</sup>

## 4.2 Heparininteraktion von HCII in Gegenwart divalenter Kationen

Zum Inhalt dieser Arbeit gehörten Untersuchungen der HCII-Wechselwirkung mit Heparin. HCII besitzt die Eigenschaft an Heparin und heparinähnliche Glykosaminoglykane zu binden. Obwohl die physiologische Wechselwirkung von HCII mit Glykosaminoglykanen noch weitgehend ungeklärt ist, ist diese Interaktion eine notwendige Bedingung für eine effektive Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII *in vitro*.

Da HCII schon bei geringer Ionenstärke von Heparin-Sepharose eluiert, ist die Affinität von HCII zu Heparin nur moderat. Schon physiologische Ionenstärken können somit die HCII/Heparin-Interaktion stören, gleichwohl wird vermutet, dass die HCII-Affinität zu Glykosaminoglykanen *in vivo* höher sein muss<sup>1</sup>. Während andere Arbeitsgruppen dieses Problem mit der Suche nach effektiveren Glykosaminoglykanen zu beantworten versuchen<sup>2</sup>, wird hier die Beeinflussung der HCII/Heparin-Interaktion durch einfache Kofaktoren beschrieben. Bei der Auswahl solcher Kofaktoren schienen Zinkionen eine sinnvolle Wahl zu sein, da Heparin, einer der wichtigen Aktivatoren von HCII, Zinkionen bindet<sup>3</sup> und bekannt ist, dass die Bindung von Kationen an Glykosaminoglykane auch die Struktur oder Funktion von assoziierten Proteinen beeinflussen kann<sup>4</sup>. So zeigen das  $\beta$ A4-Amyloid-Precursor-Protein (APP) oder das Prion-Protein PrP in Gegenwart von Zinkionen oder anderen divalenten Kationen eine verstärkte Bindung an Heparin oder heparinartige Glykosaminoglykane<sup>5</sup>. Des Weiteren konnten einige Motive im humanen HCII identifiziert werden, die eine Interaktion mit  $Zn^{2+}$ -Ionen bewirken könnten. So enthält HCII eine Aminosäuresequenz (HExxH), die einem Teil des Bindemotivs von Zink-koordinierenden Proteinen gleicht<sup>6</sup>. Auch ist die Bindung von Zinkionen über einen Cluster von sauren Aminosäuren bekannt<sup>7</sup>, wie er in der N-terminalen Domäne von HCII vorliegt (Aminosäurepositionen 49-75).

Die Bindungsstudien am HCII in Gegenwart von divalenten Kationen wurden als analytische Chromatographie mit Hilfe eines FPLC<sup>®</sup>-Systems oder als molekulare Interaktionsanalyse mittels Oberflächenplasmonresonanz durchgeführt.

---

<sup>1</sup> Mitchell & Church, 2002

<sup>2</sup> Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a, b</sup>

<sup>3</sup> Parrish & Fair, 1981; Woodhead *et al.*, 1986

<sup>4</sup> Björk *et al.*, 1989; Renne *et al.*, 2000

<sup>5</sup> Bush *et al.*, 1994; Pan *et al.*, 2002

<sup>6</sup> Alberts *et al.*, 1998; Cummins *et al.*, 1999; Fushimi *et al.*, 1999

<sup>7</sup> Brand *et al.*, 1988; Uversky *et al.*, 2000<sup>a</sup>

### 4.2.1 Bestimmung der relativen Heparinaffinität im chromatographischen System

Relative Affinitäten von Proteinen an einen immobilisierten Liganden lassen sich durch die zur Elution notwendige Ionenstärke ausdrücken. Diese Methodik liefert keine absolute Werte, eignet sich aber gut, um Änderungen der Affinitäten zu verdeutlichen und ist im Fall von HCII gebräuchlich<sup>1</sup>. Die Elution wurde durch eine linear ansteigende NaCl-Konzentration induziert. Die die Elution verursachende NaCl-Konzentration konnte durch die zur Ionenstärke proportionale Leitfähigkeit ermittelt werden. Der Nachweis der Proteine in den Eluatfraktionen erfolgte durch einen Western-Blot (3.4.3), welcher auch die Kontrolle der Integrität der eluierten Proteine ermöglichte.

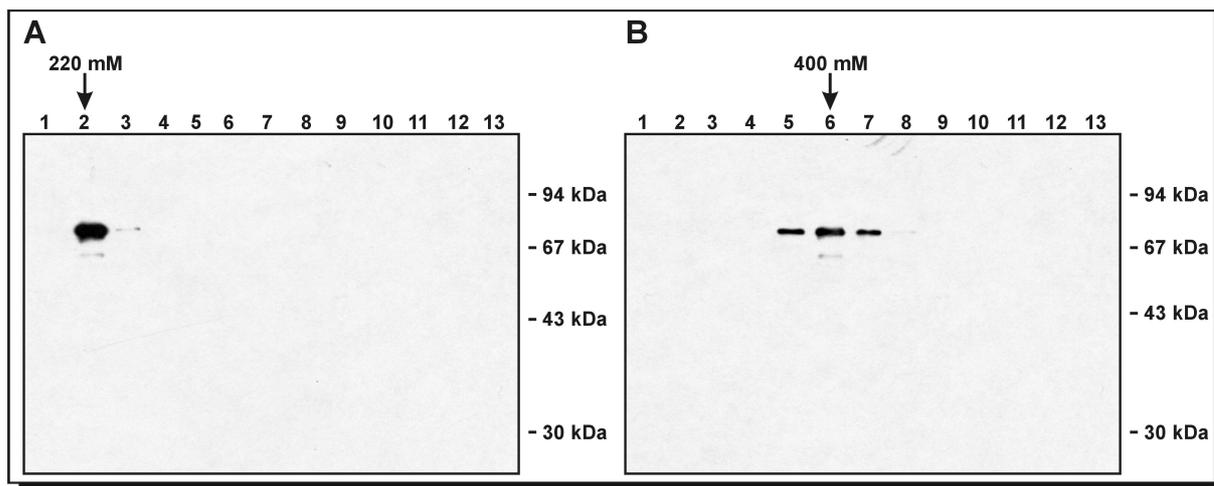
#### 4.2.1.1 Relative Heparinaffinität von HCII

Der Einfluss von divalenten Kationen auf die Heparinbindung von anderen Proteinen ist in der Literatur bereits beschrieben<sup>2</sup>. Die Untersuchungen zur relativen Heparinaffinität von HCII in Anwesenheit verschiedener divalenter Kationen wurde wie unter 3.10.2 beschreiben durchgeführt. Gereinigtes HCII aus humanem Plasma wurde auf eine 1 mL Heparin-Sepharosesäule gebunden und durch einen NaCl-Gradienten eluiert. Dabei enthielten Lauf- wie auch Elutionspuffer verschiedene zweiwertige Kationen in mikromolaren Konzentrationen. Um relative Heparinaffinitäten unter verschiedenen Bedingungen vergleichen zu können, mussten alle Versuche mit dem selben Säulenmaterial vorgenommen werden. Von der HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP Sepharose<sup>TM</sup>-Matrix eluierte HCII in Abwesenheit von Kationen in einem Bereich von 180 bis 260 mM NaCl. Der größte Anteil des eluierten Proteins sammelte sich in einer Fraktion, die im Mittel 220 mM NaCl enthielt (Abbildung 4.2-1, Bild A). Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen, jedoch mit 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> in allen verwendeten Puffern, eluierte HCII von Heparin bei merklich höheren Ionenstärken. Die zur Elution notwendige NaCl-Konzentration betrug zwischen 370 und 470 mM, mit einem Elutionsmaximum bei ca. 400 mM NaCl (Abbildung 4.2-1, Bild B). Die relative Heparinaffinität wurde durch die Anwesenheit von Zinkionen nahezu verdoppelt.

---

<sup>1</sup> Blinder & Tollefsen, 1990; Bauman & Church, 1999; Hayakawa *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Bush *et al.*, 1994



**Abbildung 4.2-1:** Fraktionierung von HCII unter Einfluss von Zinkionen

HCII aus humanem Plasma wurde auf eine HiTrap™ Heparin HP Sepharose™ Säule gebunden und durch einen linearen NaCl-Gradienten eluiert. Das Puffersystem enthielt entweder keine zweiwertigen Kationen (A) oder aber 50  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (B). Die Spuren 1 bis 13 entsprechen den Elutionsfraktionen 6 bis 18. Der Nachweis von HCII in den Eluatens erfolgte als Western-Blot nach einer denaturierenden SDS-PAGE. Die Ionenstärke wurde durch Leitfähigkeitsmessung ermittelt.

Der Western-Blot belegt, dass das eluierte HCII intakt war und die veränderte Affinität zu Heparin nicht durch Degradation des Proteins verursacht wurde. Weitere Untersuchungen zeigten zudem, dass die Elution in Gegenwart von Zinkionen nicht durch eine mögliche Denaturierung von HCII verursacht wurde, da dieses HCII bei erneuter Chromatographie auf der Heparin-Sepharose-Matrix unter Zugabe von EDTA (1 mM), im Mittel wieder bei 220 mM NaCl eluierte (Kontrolle nicht abgebildet). Der Effekt einer Veränderung des Elutionsmaximums in Gegenwart von Zinkionen war zudem schon bei geringeren Konzentrationen an  $\text{ZnCl}_2$  zu detektieren. Ein Einfluss auf das Elutionsmaximum konnte bereits bei 15  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  beobachtet werden (Ergebnis nicht dargestellt). Das Ergebnis der höheren Affinität von HCII zu Heparin in Gegenwart von Zinkionen konnte auch auf anderen Heparin-Sepharose-Matrices reproduziert werden und war somit nicht auf eine Besonderheit einer einzigen Säulenmatrix zurückzuführen. Die ermittelte relative Affinität von HCII zu Heparin in Abwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$  liegt im Rahmen der Literaturwerte. Diese erstrecken sich über einen Bereich von 180 bis 400 mM NaCl<sup>1</sup>. Die Varianz dieser Daten wird durch die verwendeten, von einander abweichenden Affinitätsmatizes verursacht. Auch die Art und Form des Elutionsgradienten kann einen Einfluss auf die beobachtete Affinität haben. Dies verdeutlicht, dass ein Vergleich von relativen Affinitätswerten mit Literaturdaten nur eingeschränkt möglich ist und nur Daten, die auf der selben Matrix erhalten wurden, zueinander in Bezug zu setzen sind.

Neben Zinkionen wurden weitere zweiwertige Kationen aus der Gruppe der Übergangsmetalle hinsichtlich ihrer Wirkung auf die relative Affinität von HCII zu Heparin untersucht. Die Versuchsdurchführung erfolgte in gleicher Weise wie zuvor als Heparin-Sepharose

<sup>1</sup> Pratt *et al.*, 1992; Gettins *et al.*, 1996; Liaw, *et al.*, 1999

Chromatographie in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  des jeweiligen Metallkations. Als divalente Ionen der Übergangsmetalle fanden die Kationen von Mangan, Nickel, Kupfer, Kobalt und Cadmium Verwendung. Nicht alle diese Ionen besitzen eine physiologische Relevanz, wurden aber als Kontrollen in die Untersuchungen miteinbezogen. Zink besitzt mit einer Elektronenkonfiguration  $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2$  keine Fähigkeit zu  $d-d$ -Übergängen, ein Charakteristikum welches normalerweise Elemente der Übergangsgruppe kennzeichnet. Auch ähneln Zink und andere Elemente der Gruppe IIb in ihrer Elektronenkonfiguration des Elements als auch des Ions eher den Elementen der zweiten Hauptgruppe. Daher wurden auch die beiden Kationen von Kalzium und Magnesium aus der zweiten Hauptgruppe des Periodensystems für Untersuchungen herangezogen. Die Ergebnisse der Bestimmung von relativen Affinitäten sind in Form von Tabelle 4.2-1 wiedergegeben.

**Tabelle 4.2-1:** Effekt von divalenten Kationen auf die rel. Bindungsaffinitäten an Heparin HP Sepharose™

Protein	Kationen	Elutionsmaximum (mM NaCl)
HCII	ohne Kationen oder in Gegenwart von EDTA	220
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	400
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Mn}^{2+}$	220
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Ni}^{2+}$	280
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$	270
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Co}^{2+}$	250
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	230
	1000 $\mu\text{M}$ $\text{Mg}^{2+}$	220
	1000 $\mu\text{M}$ $\text{Ca}^{2+}$	220
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$ , 1000 $\mu\text{M}$ $\text{Mg}^{2+}$	400
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$ , 1000 $\mu\text{M}$ $\text{Ca}^{2+}$	400
$\alpha$ -Thrombin	ohne Kationen	500
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	500

Relative Bindungsaffinitäten der heparinbindenden Proteine zu Heparin HP Sepharose™, ermittelt durch Affinitätschromatographie (FPLC).

Von den untersuchten Kationen waren neben  $\text{Zn}^{2+}$  lediglich die Ionen von Nickel, Kupfer und in etwas geringerem Ausmaß Kobalt, befähigt die Heparinaffinität von HCII zu beeinflussen. Andere Kationen zeigten keine Änderung des Elutionsmaximums. Der erzielte Einfluss von Nickel-, Kupfer- und Kobaltionen auf die Heparinaffinität von HCII war wesentlich geringer als der Effekt, der durch Zinkionen erzielt wurde. In der Literatur finden sich verschiedene Beispiele, bei der Proteine mit spezifischer Zinkaffinität im geringeren Umfang auch durch Kupfer- und Nickelionen beeinflusst werden<sup>1</sup>. Die Ionen der Elemente Magnesium und Kalzium zeigten keine Beeinflussung der Heparinaffinität von HCII. Auch in physiologischen Konzentrationen (1 mM)<sup>2</sup> zeigten diese Ionen keinen Effekt auf das Elutionsverhalten, noch waren diese Ionen in Konkurrenzexperimenten in der Lage, den durch 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$

<sup>1</sup> Kluszynski *et al.*, 1997; Borza & Morgan, 1998; Horne *et al.*, 2001

<sup>2</sup> Corkey *et al.*, 1986

verursachten Effekt zu unterbinden. Durch diese Konkurrenzexperimente konnte ein unspezifischer, rein ionischer Effekt von  $Zn^{2+}$  auf die HCII/Heparin Wechselwirkung ausgeschlossen werden. Die Änderung der Heparinaffinität durch Zinkionen war spezifisch für HCII, wie durch Kontrollexperimente mit  $\alpha$ -Thrombin belegt werden konnte. Diese Serinprotease besitzt zwei mögliche Heparin-Bindestellen und eluiert von Heparin-Sepharose zwischen 500 und 650 mM NaCl<sup>1</sup>. Die hier vorgenommenen Untersuchungen zeigten ein Elutionsmaximum von  $\alpha$ -Thrombin bei ca. 500 mM NaCl, das unabhängig von der Anwesenheit von 50  $\mu$ M  $ZnCl_2$  war. Der Effekt, den Zinkionen auf die HCII/Heparin-Wechselwirkung haben, ist somit spezifisch für HCII.

#### 4.2.1.2 Relative Heparinaffinität des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes

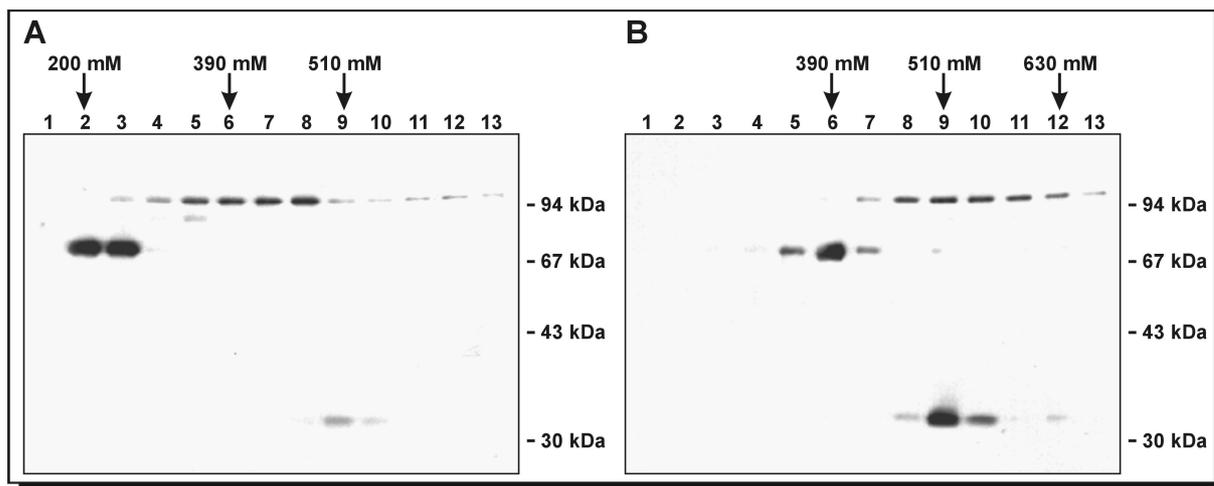
Neben der Affinität von HCII zu Heparin ist ebenso die Wechselwirkung des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes mit Heparin von Interesse. Beide Komponenten des SDS-stabilen Komplexes, Protease wie auch HCII, besitzen Heparinbindestellen.  $\alpha$ -Thrombin besitzt zwei anionenbindende Domänen, bindet an Heparin aber ausschließlich über die Exosite II. Die zweite Anionenbindestelle (Exosite I) ist beim Komplexierungsmechanismus mit HCII von Bedeutung<sup>2</sup>. Bisher konnte die Affinität des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes zu Heparin nicht eindeutig geklärt werden, da die Elutionswerte des Komplexes weder denen von HCII noch denen von  $\alpha$ -Thrombin entsprechen<sup>3</sup>. Als Lösungsansatz zu diesem Problem wurden Affinitätsuntersuchungen des Komplexes an Heparin-Sepharose unter Verwendung von 50  $\mu$ M  $Zn^{2+}$  im Puffersystem vorgenommen, welches die Affinität zu HCII, aber nicht die zu  $\alpha$ -Thrombin beeinflusst (s.u.). Die Komplexierung wurde wie unter 3.10.1 beschrieben in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen durchgeführt, um eine Konkurrenz zwischen immobilisiertem Heparin der Affinitätsmatrix und Glykosaminoglykanen im Analyten zu verhindern. Die Fraktionierung des Reaktionsansatzes mit allen darin enthaltenen Komponenten wurde wie unter 3.10.2 beschrieben mit einem FPLC<sup>®</sup>-System durchgeführt. Das Ergebnis als Western-Blot ist in Abbildung 4.2-2 wiedergegeben.

---

<sup>1</sup> Pratt & Church, 1992; Ding & Xu, 1995; Han & Tollefsen, 1998

<sup>2</sup> Sheehan *et al.*, 1994

<sup>3</sup> Böhme, 2001



**Abbildung 4.2-2:** Fraktionierung von HCII,  $\alpha$ -Thrombin und deren Komplex unter den Einfluss von Zinkionen. Ein HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexierungsansatz wurde einer Chromatographie auf HiTrap<sup>™</sup> Heparin HP Sepharose<sup>™</sup> unterworfen. Die Elution erfolgte gegen einen linear ansteigenden NaCl-Gradienten (0 - 1 M) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von  $50 \mu\text{M ZnCl}_2$ . Die Spuren 1-13 sind Eluatfraktionen des linearen Gradienten von 170 bis 670 mM NaCl. Die Detektion erfolgte durch einen Western-Blot mit Primärantikörpern gegen HCII sowie  $\alpha$ -Thrombin. In den dargestellten Bildern sind die Banden den Komplexbestandteilen folgendermaßen zuzuordnen: HCII (72 kDa),  $\alpha$ -Thrombin (33 kDa), Komplex (ca. 110 kDa).

Die HCII-Affinität zu Heparin wurde durch Zinkionen beeinflusst, die von  $\alpha$ -Thrombin jedoch nicht. In Abwesenheit von Zinkionen eluierte HCII über einen Bereich von 200 bis 245 mM NaCl und in Gegenwart von  $50 \mu\text{M ZnCl}_2$  bei höheren NaCl-Konzentrationen von 340 bis 430 mM. Demgegenüber blieb die Elution von  $\alpha$ -Thrombin von Zinkionen unbeeinflusst. In beiden Fällen betrug die zur Elution der Serinprotease notwendige NaCl-Konzentration 470 bis 550 mM. Damit bestätigte die Fraktionierung des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes an Heparin-Sepharose die zuvor gemachten Aussagen (Tabelle 4.2-1). Der Komplex aus HCII und  $\alpha$ -Thrombin ist im 10 % SDS-PAGE als ca. 110 kDa Bande sichtbar. Sein Elutionsverhalten war ebenso wie das von HCII mittels Zinkionen modifiziert. Der größte Anteil des Komplexes eluierte unter Standardbedingungen zwischen 335 und 470 mM NaCl. Doch bei Anwesenheit von Zinkionen ( $50 \mu\text{M}$ ) im Puffersystem waren höhere Ionenstärken (470 bis 630 mM NaCl) notwendig um den Komplex zu eluieren. Eine Angabe von Elutionswerten des Komplexes ist nicht exakt möglich, da der Komplex über sehr viele Fraktionen eluierte. Zweifelsfrei erkennbar ist die Tatsache, dass die Gegenwart von Zinkionen einen Einfluss auf die Affinität des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes zu Heparin hatte. Damit besteht die Möglichkeit, dass der HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplex über die Heparinbindestelle vom HCII an Heparin gebunden wird, da er wie reines HCII – aber im Gegensatz zu  $\alpha$ -Thrombin - eine Affinitätssteigerung durch die Ionen erfährt.

### 4.2.2 Bindungsstudien von HCII an immobilisiertem Heparin

Durch chromatographische Untersuchungen konnte die relative Affinität von HCII zu Heparin und der Einfluss von Zinkionen bestimmt werden. Mit einer unabhängigen Methode sollten diese Ergebnisse überprüft und weitergehende Untersuchungen vorgenommen werden. Die Wechselwirkung zwischen HCII und Heparin sollte durch molekulare Interaktion zwischen dem immobilisierten Liganden (Heparin) und HCII in der mobilen Phase (Analyt) durch SPR-Bindungsstudien (Oberflächenplasmonresonanz, *surface plasmon resonance*) mittels eines Biacore-Instruments untersucht werden. Die Änderung des Brechungsindex ist proportional zur Bindung des Analyten an den Liganden der Sensoroberfläche und resultiert in einer Änderung des SPR-Signals. Dieses wird in Form von RU-Werten (*Response Units*) als Funktion der Zeit dargestellt. Die Oberflächenplasmonresonanz wurde bereits für Interaktionsstudien von Proteinen mit Heparin eingesetzt, wobei die Immobilisierung durch ein Heparin-Albumin-Konjugat<sup>1</sup> oder durch biotinyliertes Heparin<sup>2</sup> vorgenommen wurde. Auch die Bedeutung von divalenten Kationen für die Heparinbindung von Proteinen mittels SBR-Bindungsstudien ist in der Literatur beschrieben<sup>3</sup>. In dieser Arbeit wurde ein ähnliches Modell für die Interaktionsstudien von HCII an Heparin entworfen. Für die Darstellung der funktionalisierten Sensoroberfläche wurden kommerziell verfügbare Komponenten verwendet. Der Sensorchip SA (Biacore AB, siehe Tabelle 3.10-4) war bereits mit Streptavidin konjugiert und Heparin-Biotin wurde von Calbiochem bezogen. Die einfache Konstruktion der immobilisierten Oberfläche durch kommerzielle Komponenten gewährleistete eine schnelle und reproduzierbare Herstellung des funktionalisierten Biosensors.

Die Immobilisierung des biotinylierten Heparins erfolgte wie unter 3.10.4.1 beschrieben in dem Biacore® 3000 System. Die Kontaktzeit des Liganden mit der Sensoroberfläche betrug 3 Minuten bei einer Flussgeschwindigkeit von 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Der mittlere Immobilisierungsgrad verschiedener Ligand-Immobilisierungen lag bei 60 bis 120 RU.

#### 4.2.2.1 Kontrolle der Funktionalität des Biochips

Der durch die Immobilisierung von Heparin generierte Biochip musste vor Beginn der Messreihen auf seine Funktionalität überprüft werden. Generell sollte HCII an die Heparin-konjugierte Chipoberfläche binden und diese Bindung sollte spezifisch über den Liganden erfolgen. Zur Kontrolle der Bindung von HCII an die Sensoroberfläche wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Wie bereits beschrieben, wird die HCII/Heparin-Wechselwirkung bei steigender Ionenstärke im umgebenden Milieu verringert. Daher wurde der Analyt (HCII) mit unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl im Puffer an der

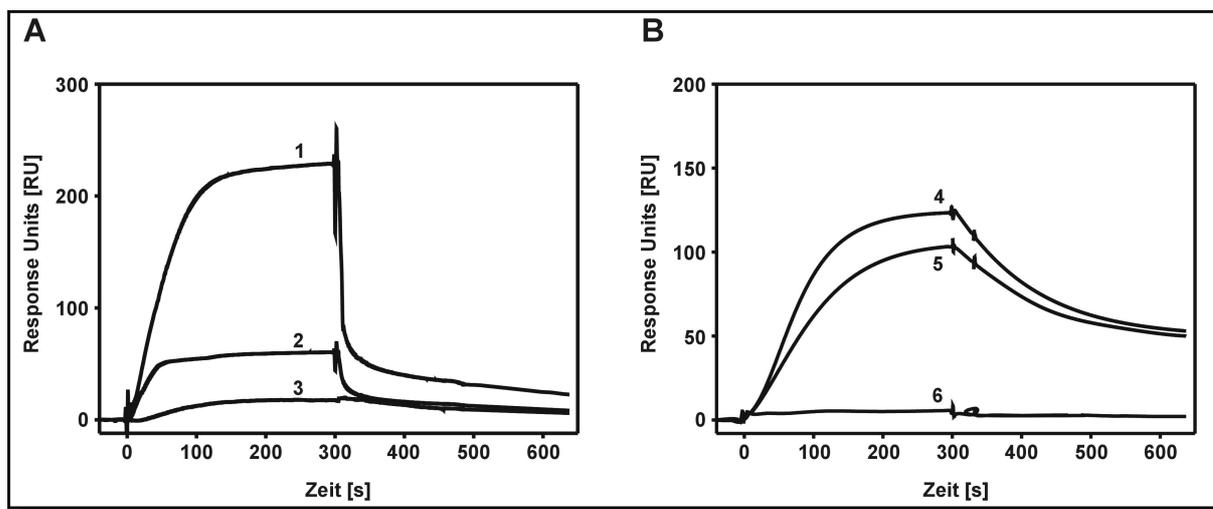
---

<sup>1</sup> Zhang *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Williams & Straus, 1997; Hernaiz *et al.*, 2000; Kett *et al.*, 2003

<sup>3</sup> Borza & Morgan, 1998; Isawa *et al.*, 2002; Ricard-Blum, 2004

Chipoberfläche gebunden. Die Interaktionsuntersuchungen wurden wie in Tabelle 3.10-5 beschrieben vorgenommen.



**Abbildung 4.2-3:** SPR Sensorgramme zur Kontrolle der Bindungsspezifität von HCII an den Biosensor.

A: HCII (0,09 µM) bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen im Analyten (1: 0 mM; 2: 50 mM; 3: 150 mM NaCl jeweils in 10 mM HEPES, 0,005% (v/v) Tween 20, 3 mM EDTA, pH 7,4).

B: Konkurrenz der Bindung von HCII (0,2 µM) durch lösliches Heparin im Analyten (4: 0 nM; 5: 50 nM; 6: 400 nM Heparin jeweils in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0,005% (v/v) Tween 20, 3 mM EDTA, pH 7,4).

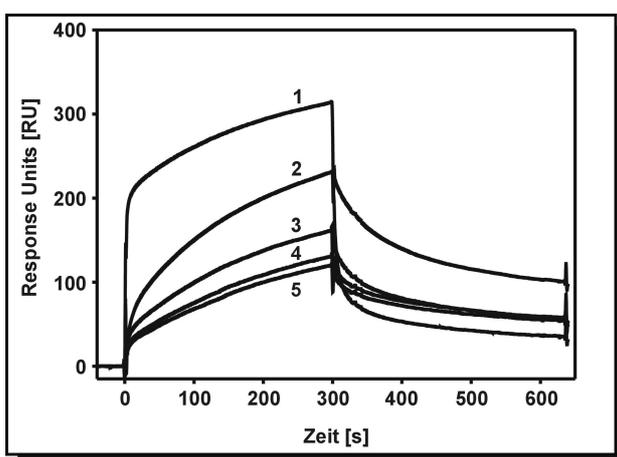
Wie in Abbildung 4.2-3, A dargestellt, nahm die Menge des an der Chipoberfläche gebundenen HCII mit steigender NaCl-Konzentration im Puffer ab. Dies kann als indirekter Nachweis für die HCII/Heparin Interaktion auf der Sensoroberfläche angesehen werden. Die in Abbildung 4.2-3 dargestellten Bindungskurven stellen typische Sensorgramme der HCII/Heparin Interaktion dar. Die Injektionsphase (0 – 300 Sekunden) war durch eine erhöhte Massendetektion (als *Response Units*, RU) gekennzeichnet, welche in eine unterschiedlich ausgeprägte Sättigung mündete. Nach Beendigung der Probeninjektion kam es zur Dissoziation des gebundenen Analyten und zu einem unterschiedlich starken Abfall der *Response*. In der Dissoziationsphase (300 – 600 Sekunden) überspülte ein Laufpuffer die Sensoroberfläche, welcher 150 mM NaCl enthielt. Dies erklärt auch das starke Abfallen der *Response* in Bild A (Abbildung 4.2-3). Hier wurde in den Proben 1 und 2, HCII in Gegenwart geringer NaCl-Konzentrationen (0 und 50 mM) an den Biochip gebunden. Die Dissoziation fand in Gegenwart höherer NaCl-Konzentrationen statt als die Bindung, was die Dissoziation verursachte. Die Interaktionsanalysen an dem Heparin-konjugierten Biochip belegten einen Einfluss von NaCl auf das Ausmaß der Bindung von HCII, wie es für eine HCII/Heparin Interaktion zu erwarten war.

Einen direkteren Beleg für die Spezifität der Bindung stellten Untersuchungen mit löslichem Liganden im Analyten dar. Die Interaktionsexperimente an immobilisiertem Heparin wurden mit HCII im Analyten durchgeführt, welchem gelöstes Heparin zugefügt war. Es bestand somit eine Konkurrenz zwischen gelöstem und immobilisiertem Heparin. In Abbildung 4.2-3, B ist zu erkennen, dass bei Anwesenheit von Heparin im Analyten die Bindung von

HCII an die Sensoroberfläche konzentrationsabhängig abnahm. Gelöstes Heparin war besser zugänglich für HCII und eine Bindung an das Heparin der Chipoberfläche erfolgte nicht mehr oder nur in geringem Ausmaß. Diese Ergebnisse sind ein direkter Beleg für die Spezifität der Heparin-vermittelten Bindung von HCII an die Sensoroberfläche.

#### 4.2.2.2 Interaktion von HCII mit Heparin in Gegenwart divalenter Kationen

Die in Abschnitt 4.2.1.1 dargestellten Ergebnisse belegten einen Einfluss von divalenten Kationen auf die relativen Affinitäten von HCII zu Heparin-Sepharose (4.2.1.1). Untersuchungen auf dem Heparin-konjugierten Biochip sollten diese Ergebnisse verifizieren. Die Bindungsstudien folgten der beschriebenen Vorgehensweise (siehe 3.10.4.2) mit HCII ( $0,75 \mu\text{M}$ ) als Analyt, unter Zusatz von divalenten Kationen ( $50 \mu\text{M}$ ). Abbildung 4.2-4 zeigt die Sensorgramme der Bindung von HCII an Heparin unter dem Einfluss verschiedener Übergangsmetallionen.



**Abbildung 4.2-4:** Effekt divalenter Kationen auf die Bindung von HCII an immobilisiertes Heparin. Injektion von HCII ( $0,75 \mu\text{M}$ ,  $20 \mu\text{L}/\text{min}$ ) in Gegenwart unterschiedlicher Kationen (1:  $\text{Zn}^{2+}$ ; 2:  $\text{Cu}^{2+}$ ; 3:  $\text{Ni}^{2+}$ ; 4:  $\text{Co}^{2+}$  oder  $\text{Cd}^{2+}$ ; 5:  $\text{Mn}^{2+}$  oder ETDA, je  $50 \mu\text{M}$  in  $10 \text{ mM}$  HEPES,  $150 \text{ mM}$  NaCl,  $0,005\%$  (v/v) Tween 20, pH 7,4).

Wie in der Abbildung 4.2-4 zu erkennen ist, zeigten die Kationen von Zink, Kupfer und Nickel, welche auch einen Einfluss auf die relativen Affinitäten an Heparin-Sepharose hatten, eine Beeinflussung der HCII-Bindung an den Heparin-konjugierten Biochip.

In Abwesenheit von Kationen betrug die maximale *Response* am Ende der Injektionsphase  $125 \text{ RU}$  (Sensorgramm 5). Ionen von Mangan, Kobalt oder Kadmium beeinflussten die Bindung nur im geringen Ausmaß oder gar nicht. Lediglich Nickel- ( $\text{RU}: 160$ ), Kupfer- ( $\text{RU}: 230$ ) und Zinkionen ( $\text{RU}: 315$ ) wirkten sich auf die Bindungseigenschaft von HCII an Heparin aus. In Gegenwart von  $50 \mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  war die erreichte *Response* mit  $315 \text{ RU}$  mehr als 2,5 mal so hoch als in Abwesenheit von divalenten Ionen. Neben der größten maximalen Bindung von HCII zeigten Zinkionen auch den stärksten Effekt auf die Bindungsgeschwindigkeit. Dies wird durch den sprunghaften Anstieg der *Response* innerhalb der ersten 20 Sekunden der Injektion deutlich. Die Effekte der unterschiedlichen Ionen auf die maximale *Response* der Bindung sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 4.2-2:** Effekt von divalenten Kationen auf die Bindung von HCII an immobilisiertes Heparin

Protein	Kationen	Responsezunahme in Prozent <sup>a</sup>
HCII	50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	252
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Cu}^{2+}$	184
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Ni}^{2+}$	128
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Cd}^{2+}$	107
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Co}^{2+}$	105
	50 $\mu\text{M}$ $\text{Mn}^{2+}$	100
	ohne Kationen oder in Gegenwart von EDTA	100

<sup>a</sup> Bindung von HCII (0,75  $\mu\text{M}$ ) an einen Heparin-konjugierten Biochip. Die Ergebnisse sind als prozentualer Zuwachs der maximalen *Response* von der Basislinie (Nulllinie) dargestellt.

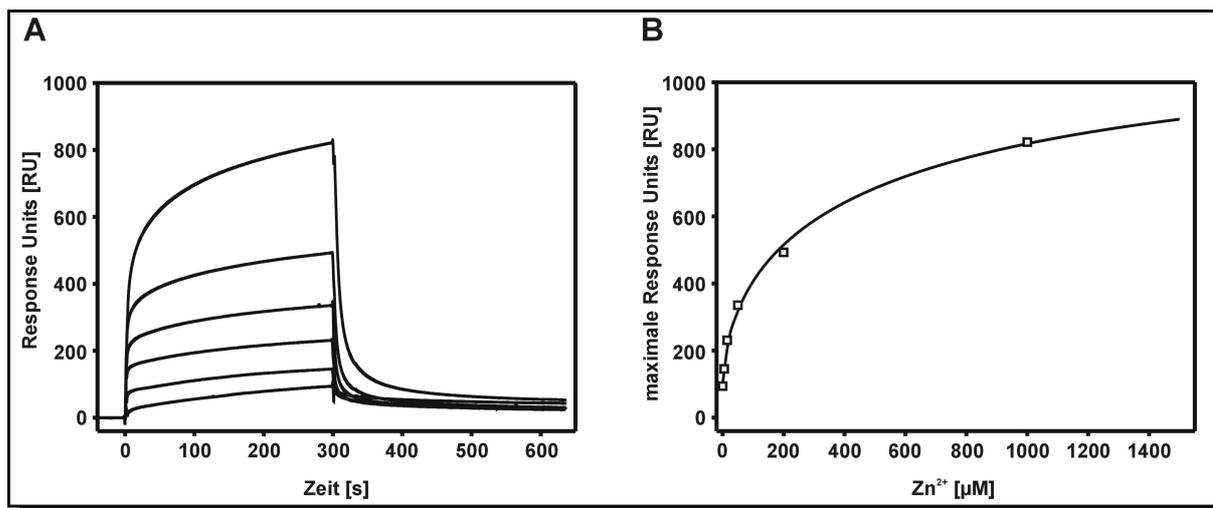
Zink- und Kupferionen waren unter physiologischen Bedingungen effektiver in der Beeinflussung der Heparinbindung von HCII als Nickelionen. Mangan-, Kobalt- oder Cadmiumionen zeigten keine Wirkung auf die Bindung von HCII. Die hier erzielten Ergebnisse bezüglich der Wirkung verschiedener divalenter Kationen auf die Heparinbindung von HCII sind in ihrer Tendenz vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Daten für die Bindung anderer Proteine an Heparin. Proteine, die hinsichtlich einer Zinkbindung untersucht wurden oder für welche eine Beeinflussung ihrer Heparinbindung durch Zinkionen beschrieben ist, werden meist auch durch Kupferionen, jedoch weniger durch Mangan- oder Nickelionen beeinflusst <sup>1</sup>.

Die hier erhaltenen Bindungskurven dokumentieren die Menge an gebundenem HCII unter Zusatz der verschiedenen Ionen und sind nicht mit den relativen Affinitäten an Heparin-Sepharose gleichzusetzen (siehe 4.2.1.1). An Heparin-Sepharose wurde die Stärke der HCII/Heparin Wechselwirkung in Form ihres Elutionsmaximums im NaCl-Gradienten ermittelt. Dagegen repräsentieren die Bindungskurven im Biacore das Ausmaß der Bindung und ihre Geschwindigkeit. Wenn auch die Ergebnisse der unterschiedlichen Methoden nicht direkt in Bezug zu setzen sind, sind die ermittelten Tendenzen beider Methoden durchaus vergleichbar.

#### 4.2.2.3 Interaktion von HCII mit Heparin in Abhängigkeit der $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration

In Abschnitt 4.2.2.2 wurde die Verstärkung der Bindung von HCII an immobilisiertes Heparin durch 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  beschrieben. Nachfolgend wurden Untersuchungen vorgenommen, um zu überprüfen, ob diese Beobachtung ein spezifischer Effekt der Zinkionen war. Es bestand die Möglichkeit, dass die Zinkionen selbst die höhere *Response* an immobilisiertem Heparin verursachten oder dass HCII in Gegenwart von  $\text{Zn}^{2+}$  unspezifisch mit der Sensoroberfläche reagiert. Dazu wurden Interaktionsstudien am Biochip vorgenommen, mit HCII (0,75  $\mu\text{M}$ ) im Analyten, dem unterschiedliche Konzentrationen an  $\text{ZnCl}_2$  zugesetzt wurden. Die Ergebnisse dieser „Titrationsreihe“ sind in Abbildung 4.2-5 als Sensorgramme wiedergegeben.

<sup>1</sup> Yip *et al.*, 1989; Borza & Morgan, 1998; Chavakis *et al.*, 1999



**Abbildung 4.2-5:** Effekt der  $Zn^{2+}$ -Konzentration auf die Interaktion zwischen HCII und immobilisiertem Heparin.

A: Sensorgramme der Bindung von HCII ( $0,75 \mu\text{M}$  in  $10 \text{ mM HEPES}$ ,  $150 \text{ mM NaCl}$ ,  $0,005\%$  (v/v) Tween 20,  $\text{pH } 7,4$ ) an den Heparin-konjugierten Biochip in Gegenwart von Zinkionen (von unten nach oben:  $0$ ,  $5$ ,  $15$ ,  $50$ ,  $200$  und  $1000 \mu\text{M}$ ).

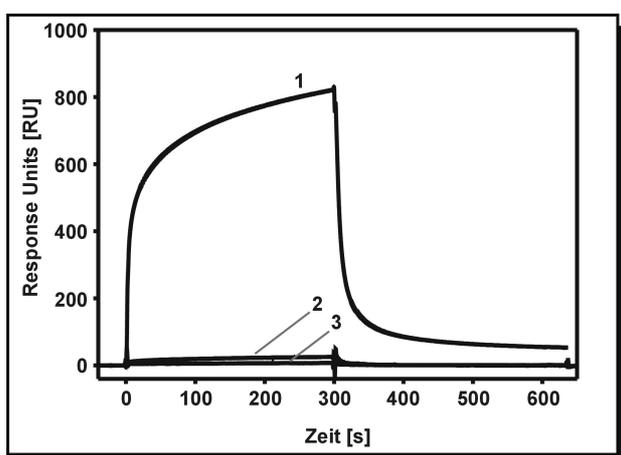
B: Darstellung der maximalen erreichten *Response* am Ende der Injektionsphase ( $t = 300$  Sekunden) in Abhängigkeit der Zinkionenkonzentration. Die verwendeten Daten wurden den Sensorgrammen aus Bild A entnommen.

Bild A (Abbildung 4.2-5) zeigt die Bindung von HCII an Heparin in der Injektionsphase im Zeitbereich von 0 bis 300 Sekunden. Den Sensorgrammen war eine Abhängigkeit der HCII-Bindung von der Zinkkonzentration im Analyten zu entnehmen. Diese Abhängigkeit zeigte sich in einer starken Zunahme der *Response*, gleichbedeutend mit einer quantitativ höheren Assoziation von HCII an Heparin. Neben der höheren Assoziation war auch eine Zunahme der Assoziationsgeschwindigkeit mit steigender Zinkionenkonzentration zu beobachten. Ein solcher Effekt wurde auch bei Interaktionsstudien von anderen heparinbindenden Proteinen in Gegenwart von Zinkionen beobachtet<sup>1</sup>.

Bild B (Abbildung 4.2-5) zeigt einen Plot der maximal erreichten *Response* bei Ende der Injektionsphase in Abhängigkeit der eingesetzten  $Zn^{2+}$ -Konzentration. Die maximale *Response* steigt mit der  $Zn^{2+}$ -Konzentration in Form einer Hyperbel an und erreicht bei hohen Zinkionen-Konzentrationen eine Sättigung. Unspezifische Bindungen von HCII an den Biochip in Gegenwart von Zinkionen, wie auch Reaktionen der Proteinmoleküle miteinander sind daher weitgehend auszuschließen, da diese zu einem linearen Anstieg der *Response* mit der Ionenkonzentration führen würden. Die Abhängigkeit der erzielten *Response* von der Zinkkonzentration ist ein Beleg für einen spezifischen Einfluss der divalenten Kationen auf die Heparinbindung von HCII.

<sup>1</sup> Ricard-Blum *et al.*, 2004

Um die Spezifität des Einflusses der Zinkionen auf die HCII/Heparin-Interaktion zu belegen, wurden weitere Kontrollexperimente durchgeführt. Die HCII-Bindung an Heparin in Gegenwart von Zinkionen wurde in Kombination mit löslichem Heparin im Analyten untersucht. Dieses Konkurrenzexperiment gleicht dem unter 4.2.2 beschriebenen Kontrollversuch. Die Sensorgramme der Kontrollen sind in Abbildung 4.2-6 wiedergegeben. Die in Gegenwart von 1 mM  $Zn^{2+}$  erzeugte *Response* (Sensorgramm 1) der HCII-Bindung an Heparin wurde bei Zugabe von 2  $\mu$ M Heparin im Analyten (Sensorgramm 2) nahezu vollständig ausgelöscht. Dies verdeutlicht, dass die starke *Response* bei Anwesenheit von Zinkionen durch die HCII/Heparin-Interaktion verursacht wurde und nicht durch eine unspezifische Assoziation von HCII an der Sensoroberfläche. Somit demonstriert der Konkurrenzversuch, dass auch in Gegenwart von Zinkionen die Bindung von HCII über dessen Heparinbindestelle erfolgt und nicht über unspezifische Oberflächenladungen am HCII. Auch konnte gezeigt werden, dass die Responsezunahme kein Effekt der Zinkionen allein darstellt (Sensorgramm 3).

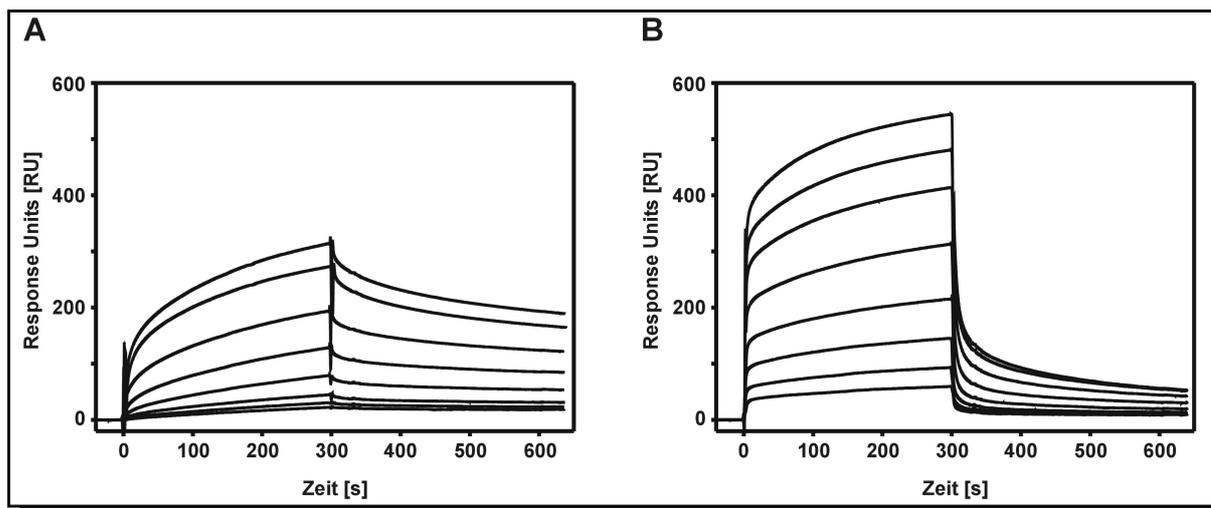


**Abbildung 4.2-6:** SPR-Sensorgramme zur Kontrolle der Wirkung von Zinkionen auf die HCII/Heparin-Interaktion in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) Tween 20, pH 7,4.

1: Bindung von HCII (0,75  $\mu$ M) an den Heparin-konjugierten Biochip in Gegenwart von 1 mM  $Zn^{2+}$   
 2: HCII (0,75  $\mu$ M),  $Zn^{2+}$  (1 mM) und Heparin (2  $\mu$ M)  
 3:  $Zn^{2+}$  (1 mM).

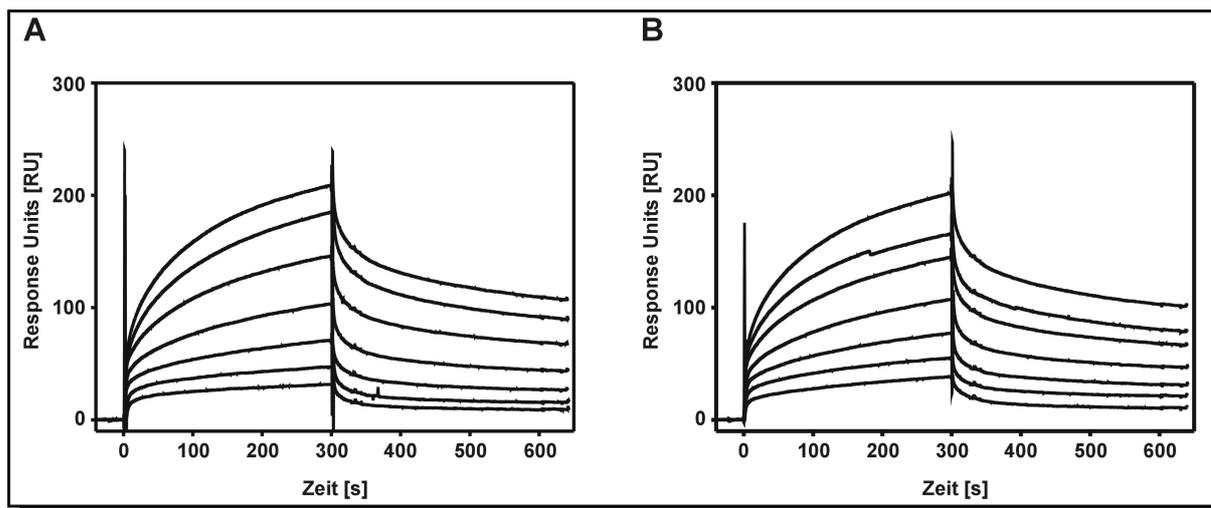
#### 4.2.2.4 Interaktion von HCII und ATIII mit immobilisiertem Heparin

Um zu zeigen, dass der Einfluss von Zinkionen auf die Heparinbindung von HCII keine auf alle heparinbindenden Proteine übertragbare Funktion darstellt, sondern eine Eigenschaft des HCII dokumentiert, wurden Untersuchungen mit einem Vergleichsprotein durchgeführt. Als Vergleichsprotein wurde ATIII gewählt, wie HCII ein Serpin, das diesem in Funktion und Struktur ähnelt und über analoge Proteindomänen und Aminosäuren seine Heparinaffinität ausbildet. HCII- und ATIII-Lösungen im Bereich der physiologischen Konzentrationen wurden jeweils ohne und mit 50  $\mu$ M  $ZnCl_2$  im Analyten über den Heparin-konjugierten Sensorchip mit einer Flussrate von 20  $\mu$ L/min geleitet. Overlays mehrerer Sensorgramme mit unterschiedlichen Proteinkonzentrationen sind für HCII in Abbildung 4.2-7 und für ATIII in Abbildung 4.2-8 wiedergegeben. Die Sensorgramme sind auf eine gemeinsame Nulllinie normiert.



**Abbildung 4.2-7:** HClII-Sensorgramme der Assoziation an immobilisiertes und der Dissoziation von immobilisiertem Heparin. Die Analyten enthielten HClII in acht verschiedenen Konzentrationen (von unten nach oben: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,7 und 3,2  $\mu\text{M}$ ) ohne Kationen (A) oder unter Zugabe (B) von  $\text{Zn}^{2+}$  (50  $\mu\text{M}$ ). Puffersystem: 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.005% (v/v) Tween 20, pH 7,4); Injektionsvolumen 120  $\mu\text{L}$ ; Flussrate 20  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Die Bindung des Proteins an der Sensoroberfläche durch Assoziation/Dissoziation ist in *Response Units* (RU) in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt wie unter 3.10.4 beschrieben.

Die Bindungskurven der Interaktion von HClII mit immobilisiertem Heparin dokumentierten den schon zuvor beschriebenen Effekt der stärkeren Bindung von HClII an Heparin in Gegenwart von Zinkionen. Die Injektion von HClII verursachte ein *Response*-Signal, welches in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration (0,04 - 3,2  $\mu\text{M}$ ) anstieg. Dieser Anstieg war sowohl in Abwesenheit und Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Analyten (A bzw. B, Abbildung 4.2-7) zu verzeichnen, in Geschwindigkeit und Ausmaß jedoch unterschiedlich ausgeprägt. In Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  verlief die Assoziation mit höherer Geschwindigkeit und resultierte in Abhängigkeit von der jeweiligen HClII-Konzentration, in zwei- bis dreimal höheren *Response*-Signalen als in Abwesenheit der Kationen. Dies belegte die gesteigerte Kapazität des Heparin-Sensorchips gegenüber HClII in Gegenwart von Zinkionen. Das Heparin-Konjugat war nicht, oder zumindest nicht allein für die zusätzliche Bindung verantwortlich. Dies konnte nachfolgend durch identisch durchgeführte Untersuchungen mit ATIII belegt werden. ATIII bindet Heparin ebenso wie HClII über vorwiegend basische Domänen, die sich in Struktur und Aufbau ähneln (2.2.2). Immobilisierte Heparinstrukturen mit Affinität zu HClII sind ebenso zur Bindung an ATIII befähigt, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität. Die Sensorgramme der ATIII-Interaktion mit immobilisiertem Heparin zeigten - im Gegensatz zu HClII - keine Beeinflussung der Bindung in Anwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$  im Analyten (Vergleich von Bild A mit B, Abbildung 4.2-8). Die Assoziationsphasen zeigten einen identischen Verlauf und auch die maximalen *Response*-Signale waren nicht wesentlich durch  $\text{Zn}^{2+}$  beeinflusst. Insgesamt verdeutlicht dies, dass der Effekt von Zinkionen auf die Bindung an Heparin proteinspezifisch ist und lediglich HClII betrifft, nicht aber ATIII.



**Abbildung 4.2-8:** ATIII-Sensorgramme der Assoziation an immobilisiertes und der Dissoziation von immobilisiertem Heparin. Die Analyten enthielt ATIII in sieben verschiedenen Konzentrationen (von unten nach oben: 0,06; 0,12; 0,25; 0,5; 1; 1,5 und 2  $\mu\text{M}$ ) in Abwesenheit (A) und Anwesenheit (B) von 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  im Puffersystem. Weitere Einzelheiten entsprechen den in Abbildung 4.2-7 beschriebenen Angaben. Die Regeneration des Sensorchips wurde in Anschluss an die Dissoziationsphase mit drei 10  $\mu\text{L}$ -Injektionen 50 mM HEPES, 2 M NaCl, pH 9,5 durchgeführt.

#### 4.2.2.5 Quantitative Bestimmung der Assoziation von HCII und ATIII an immobilisiertes Heparin

Die zuvor durchgeführten qualitativen Untersuchungen zur HCII-Bindung an Heparin unter dem Einfluss von Zinkionen sollten in nachfolgenden Bindungsstudien quantitativ charakterisiert werden. Die SPR-Technologie bietet die Möglichkeit, Bindungsparameter direkt aus dem zeitabhängigen Bindungsprozess, als auch aus den Bindungsdaten im Gleichgewicht zu bestimmen<sup>1</sup>. Innerhalb der Bindungsphase (0 - 300 Sekunden) wurde weder für HCII noch für ATIII eine statische *Response* des Gleichgewichts aus Assoziation und Dissoziation (*steady-state*) erreicht. Dies ist für die Bestimmung von kinetischen oder thermodynamischen Konstanten auch nicht zwingend erforderlich, da die kinetischen Konstanten  $k_a$  und  $k_d$  (in der Literatur häufig auch als  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  bezeichnet) für die Assoziations- und Dissoziationsgeschwindigkeit und damit auch die Stabilitätskonstante (Dissoziationskonstante)  $K_d$  direkt aus den Sensorgrammen durch mathematische Verfahren ermittelt werden können. Mit den vorliegenden Sensorgrammen war es aber nicht möglich, die Bindungskurven durch kinetische Modelle zu beschreiben. Die BiaEvaluation Software (Vers. 3.1) bietet unterschiedliche mathematische Modelle zur Auswertung der Bindungskurven, die auf einem 1:1 (Langmuir) Bindungsmodell basieren. Keines dieser Modelle konnte den zeitlichen Verlauf der Bindung von HCII korrekt wiedergeben.

Dissoziationskonstanten können auch über statische Modelle ermittelt werden. Dies wird durch Sättigungskurven der maximal erreichten *Response* und der dazugehörigen

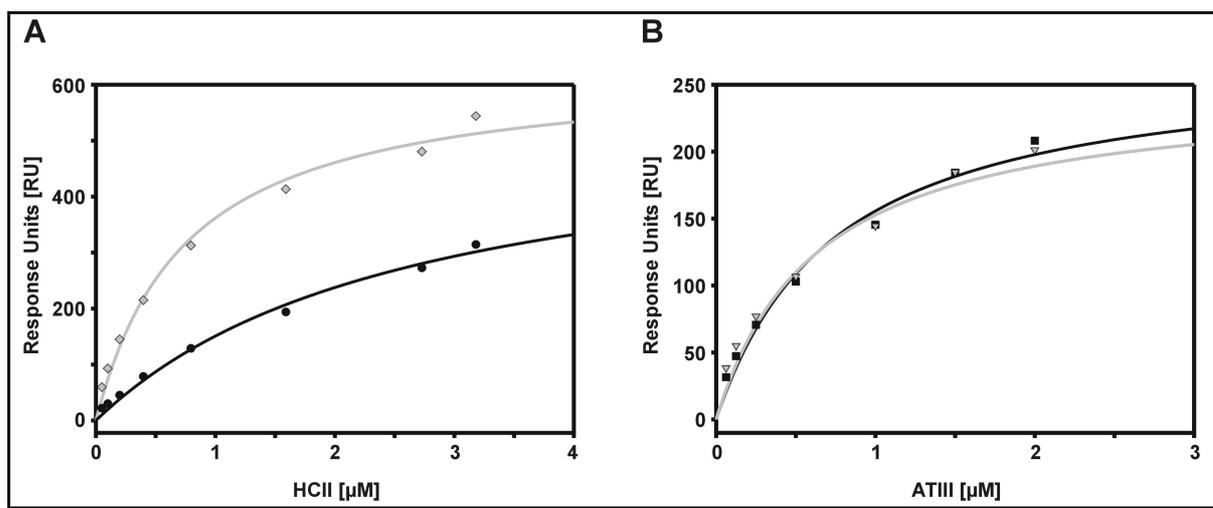
<sup>1</sup> BIAcore 3000 Instrument Handbook, Biacore AB, Schweden; Karlsson *et al.*, 1991; Nieba *et al.*, 1996

Analytkonzentration ( $A_{tot}$ ) erreicht. Mathematische Funktionen, welche die Änderung des Bindungssignals  $\Delta RU = f(A_{tot})$  wiedergeben (Gleichungen 1 und 2, s.u.), werden in der Literatur verwendet<sup>1</sup>. Iterative Näherungen des mathematischen Ausdrucks an die experimentellen Daten führten zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten  $K_d$ . Beide angeführten Funktionen ergaben trotz ihrer unterschiedlichen Komplexität gleiche Ergebnisse ( $RU_{max}$  : maximale *Response*,  $[A]_{tot}$  : Analytkonzentration,  $[L]_{bound}$  : Ligandkonzentration).

$$\Delta RU = \frac{RU_{max} \cdot [A]_{tot}}{K_d + [A]_{tot}} \quad (1)$$

$$\Delta RU = \gamma \cdot \left\{ \frac{K_d + [L]_{bound} + [A]_{tot}}{2} - \sqrt{\left( \frac{K_d + [L]_{bound} + [A]_{tot}}{2} \right)^2 - [L]_{bound} \cdot [A]_{tot}} \right\} \quad (2)$$

Die nachfolgende Abbildung stellt die Sättigungskurven der Bindung von HCII (A) und ATIII (B) an immobilisiertes Heparin unter dem Einfluss von  $Zn^{2+}$  dar, wie sie durch die Anpassung der Messwerte an obigen Funktionen erhalten werden.



**Abbildung 4.2-9:** Sättigungskurven der Bindung von HCII (A) und ATIII (B) an immobilisiertes Heparin in Abhängigkeit der Proteinkonzentration. Die Bindung der Serpine erfolgte in Abwesenheit (schwarze Kurve) oder Anwesenheit (graue Kurve) von  $50 \mu\text{M } Zn^{2+}$  im Analyten. Die verwendeten Daten wurden den in Abbildung 4.2-7 und Abbildung 4.2-8 dargestellten Sensorgrammen entnommen. Die Sättigungskurven wurden durch mathematische Anpassung an die Messwerte unter Verwendung der angeführten Funktion 2 mit dem Programm SigmaPlot erhalten.

Die Bindung von ATIII an den Heparin-konjugierten Sensorchip zeigte keine Beeinflussung durch Zinkionen. Die Sättigungskurven waren nahezu deckungsgleich, was auch in den berechneten Dissoziationskonstanten verdeutlicht wurde. Mit  $0,76$  und  $0,66 \mu\text{M}$  für die Dissoziationskonstante in Abwesenheit bzw. Anwesenheit von  $50 \mu\text{M } Zn^{2+}$  lagen die Werte

<sup>1</sup> Mach *et al.*, 1993; Nieba *et al.*, 1996; Borza & Morgan, 1998; Farr *et al.*, 1999;

innerhalb eines Größenbereichs. Hingegen konnte für HCII eine Änderung der Dissoziationskonstante beim Zusatz von  $\text{Zn}^{2+}$  registriert werden. Für die Bindung an Heparin wurden durch mathematische Näherung  $K_d$ -Werte von 2,67  $\mu\text{M}$  bzw. 0,73  $\mu\text{M}$  in Abwesenheit bzw. in Anwesenheit von Zinkionen erhalten. Eine Übersicht der errechneten Konstanten ist in nachfolgender Tabelle 4.2-3 angegeben.

**Tabelle 4.2-3:** Konstanten der Bindung von HCII und ATIII an immobilisiertem Heparin

Protein	$RU_{\max}$	$K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	$R^2$	$P$
HCII	$556 \pm 63$	$2,67 \pm 0,55$	0,9918	0,0028
HCII + 50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	$635 \pm 31$	$0,73 \pm 0,11$	0,9886	0,0009
ATIII	$281 \pm 23$	$0,76 \pm 0,15$	0,9849	0,0036
ATIII + 50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	$250 \pm 21$	$0,66 \pm 0,13$	0,9725	0,0071

Bestimmung der Konstanten  $RU_{\max}$  und der Dissoziationskonstanten  $K_d$  durch Regression mit dem Programm SigmaPlot.  $R^2$  ist ein Maß für die Qualität der mathematischen Anpassung an die experimentellen Daten.  $P$  beschreibt die Signifikanz der Messdaten bezüglich der Abweichung von der Regression ( $P < 0,05$ ).

Die HCII/Heparin-Interaktion nahm in Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  erheblich zu und die Dissoziationskonstante war für diesen Fall etwa um den Faktor 4 kleiner als ohne Kation im Analyten.

Die hier ermittelten Dissoziationskonstanten sind nur bedingt mit  $K_d$ -Werten aus der Literatur vergleichbar, die mit anderen Methoden ermittelt wurden. Für die HCII/Heparin-Interaktion sind bislang  $K_d$ -Werte von  $\sim 13$   $\mu\text{M}$  beschrieben, welche durch Fluoreszenzmessung von derivatisiertem HCII erhalten wurden<sup>1</sup>. Eine Dissoziationskonstante mit größerer Übereinstimmung findet sich bei Zhang *et al.*<sup>2</sup>, welche Parameter der HCII/Heparin-Interaktion ebenfalls mit der Methode der Oberflächenplasmonresonanz untersuchten. Der dort ermittelte  $K_d$ -Wert von  $3,03 \pm 0,89$   $\mu\text{M}$  bestätigt die hier erhaltenen Ergebnisse.

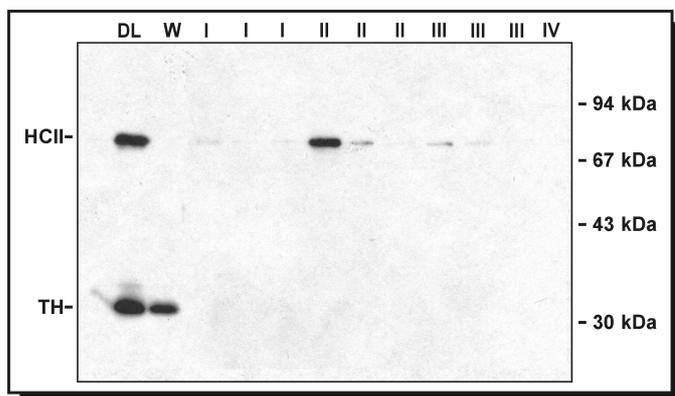
Die erzielten Ergebnisse der Heparinbindung von HCII, sowohl in chromatographischen Systemen als auch in Bindungsstudien durch SPR, belegen einen Einfluss von Zinkionen auf die Interaktion zwischen HCII und Heparin. Die Wechselwirkungen der beiden Aktionspartner nahmen in Gegenwart dieser divalenten Ionen zu. Der Einfluss von Kationen war dabei auf  $\text{Zn}^{2+}$  beschränkt, ebenso wie deren Beeinflussung der Heparinbindung bezüglich HCII.

<sup>1</sup> Weitz *et al.*, 1999

<sup>2</sup> Zhang *et al.*, 2004

### 4.3 Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Die Ergebnisse der HCII-Interaktion an Heparin-Sepharose (4.2.1) und der Oberflächenplasmonresonanz (4.2.2) belegten eine gesteigerte Affinität von HCII zu Heparin unter Einfluss von Zinkionen. Auf welche Art die Kationen die Wechselwirkung zwischen den beiden Reaktionspartnern verändert, konnte aus diesen Experimenten nicht gefolgert werden. Da Heparin ein zinkbindendes Glykosaminoglykan ist (2.3), könnte die unterschiedliche Affinität zu HCII allein durch eine Änderung am Heparin induziert werden. Ob Zinkionen auch direkt mit dem Protein interagieren und dadurch einen Beitrag zu der erhöhten Affinität für Heparin leisten, sollte durch weitere Untersuchungen kontrolliert werden. Die Metallionen-Affinitätschromatographie dient der Bestimmung von Affinitäten von Proteinen und Polypeptiden zu Metallionen<sup>1</sup>. In dieser Arbeit wurde die Fähigkeit von HCII und  $\alpha$ -Thrombin zur Bindung an  $Zn^{2+}$ -IDA (Iminodiacetat-Sepharose) untersucht. Die Bindung der Proteine wurde wie beschrieben (siehe 3.10.3) durchgeführt und eine fraktionierte Elution durch Imidazol im Eluens bewirkt. Imidazol besitzt die Fähigkeit über den Stickstoff des Heterozyklus immobilisierte Kationen zu koordinieren und auf diese Weise gebundene Proteine zu verdrängen. Abbildung 4.3-1 zeigt die Elution von gereinigtem HCII aus humanem Plasma sowie  $\alpha$ -Thrombin von  $Zn^{2+}$ -IDA in einem Stufendradienten. Die Elution erfolgte in drei Stufen mit 15, 50 und 150 mM Imidazol im Eluens. Die Kapazität der Metallionenmatrix für die untersuchten Proteine scheint gering zu sein, da bei HCII wie auch beim  $\alpha$ -Thrombin ein Teil der Probe im Durchlauf zu detektieren war.

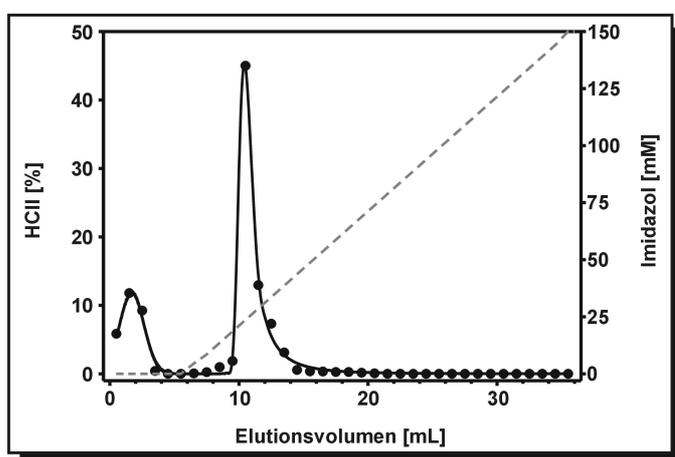


**Abbildung 4.3-1:** IMAC von HCII und  $\alpha$ -Thrombin (TH) an  $Zn^{2+}$ -IDA. Darstellung als Overlay zweier Western-Blots mit Primärantikörpern gegen die jeweiligen Proteine. Die Elution der Proteine erfolgte in drei Stufen mit Imidazol im Eluens. Fraktionen á 1,5 mL: DL: Durchlauf, W: Waschphase, I: 15 mM Imidazol, II: 50 mM Imidazol, III: 150 mM Imidazol, IV: 10 mM EDTA. Puffersystem der IMAC: 20 mM  $NaH_2PO_4$ , 500 mM NaCl, pH 7,4.

$\alpha$ -Thrombin zeigte keine Bindung an die Metallionenmatrix. Die gesamte Proteinmenge wurde im Durchlauf (DL) und in der Waschphase (W) detektiert. Durch die Imidazolkonzentrationen in den drei Elutionsstufen wurde kein weiteres Material von der Säulenmatrix freigesetzt. Hingegen konnte HCII auch in den Imidazol-enthaltenden Elutionsfraktionen registriert werden. Neben der Detektion des Proteins im Durchlauf (DL), eluierte HCII hauptsächlich zu Beginn der Elutionsstufe mit 50 mM Imidazol (II). Weitere Experimente

<sup>1</sup> Yip *et al.*, 1989; Bush *et al.*, 1994; Chavakis *et al.*, 1999

zeigten, dass HCII auch durch 5 mM EDTA von  $\text{Zn}^{2+}$ -IDA eluiert werden kann, und eine Bindung an die Ligandmatrix allein (IDA ohne gebundenes Kation) nicht erfolgt (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies belegt, dass die Bindung von HCII an  $\text{Zn}^{2+}$ -IDA durch die Kationen bedingt wurde und nicht durch unspezifische Wechselwirkungen verursacht wurde. Zur genaueren Bestimmung der Affinität von HCII zu Zinkionen wurde eine IMAC mit einem linear ansteigenden Imidazolgradienten durchgeführt.



**Abbildung 4.3-2:** Fraktionierung von HCII aus humanem Plasma durch Metallionen-Affinitätschromatographie. 20  $\mu\text{g}$  HCII (in 100  $\mu\text{L}$ ) wurden an eine  $\text{Zn}^{2+}$ -IDA-Matrix gebunden und durch Imidazol (0-150 mM) eluiert. Das Eluat wurde á 1 mL fraktioniert gesammelt und mittels ELISA quantifiziert. Die dargestellte Kurve beschreibt das HCII in der jeweiligen Eluatfraktion als prozentualen Anteil am gesamten eluierten HCII.

Die Fraktionierung von HCII an  $\text{Zn}^{2+}$ -IDA durch Imidazol (0 – 150 mM) ist in Abbildung 4.3-2 dargestellt. Ein Anteil an HCII wurde im Durchlauf (0 – 4 mL) detektiert, wohingegen das gebundene Protein durch Imidazolkonzentrationen im Bereich zwischen 25 und 35 mM eluiert wurde. Dieser Befund stimmt mit dem Ergebnis der Stufenelution überein und gibt einen genaueren Wert für die relative Affinität von HCII zu Zinkionen. Ein Vergleich mit relativen Affinitäten anderer zinkbindender Proteine gestaltet sich schwierig, da die in der Literatur beschriebenen Versuche oft unterschiedlich durchgeführt wurden. Häufig wurden geringe Konzentrationen an NaCl im Puffersystem verwendet oder auf dieses ganz verzichtet. Hohe Ionenstärken im Puffersystem sind aber notwendig um unspezifische Wechselwirkungen zu unterbinden. Ein direkter Vergleich ist daher nicht sinnvoll.

## 4.4 Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES)

Die Wechselwirkung von HCII mit Zinkionen wurde durch vorherige Untersuchungen belegt und sollte weitergehend charakterisiert werden. Die Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES) wurde zu diesem Zweck verwendet, da sie Vorteile gegenüber statischen Methoden der Interaktionsbestimmung bietet. Die Reaktionspartner müssen nicht immobilisiert vorliegen und die Detektion kann ohne weitere Modifizierung durch die natürlichen (intrinsischen) Fluorophore des Proteins erfolgen. Reaktionen und Wechselwirkungen von Substraten und Kofaktoren mit dem Protein können zu Änderungen der Konformation führen, welche sich in einem veränderten Fluoreszenzspektrum widerspiegeln können. Fluoreszenzdaten enthalten keine direkten Informationen über die Sekundärstrukturen von Proteinen, doch liefern Änderungen der Fluoreszenzintensität oder des Emissionsmaximums Hinweise auf Konformationsänderungen des Proteins<sup>1</sup>.

### 4.4.1 Intrinsische Fluoreszenz von HCII

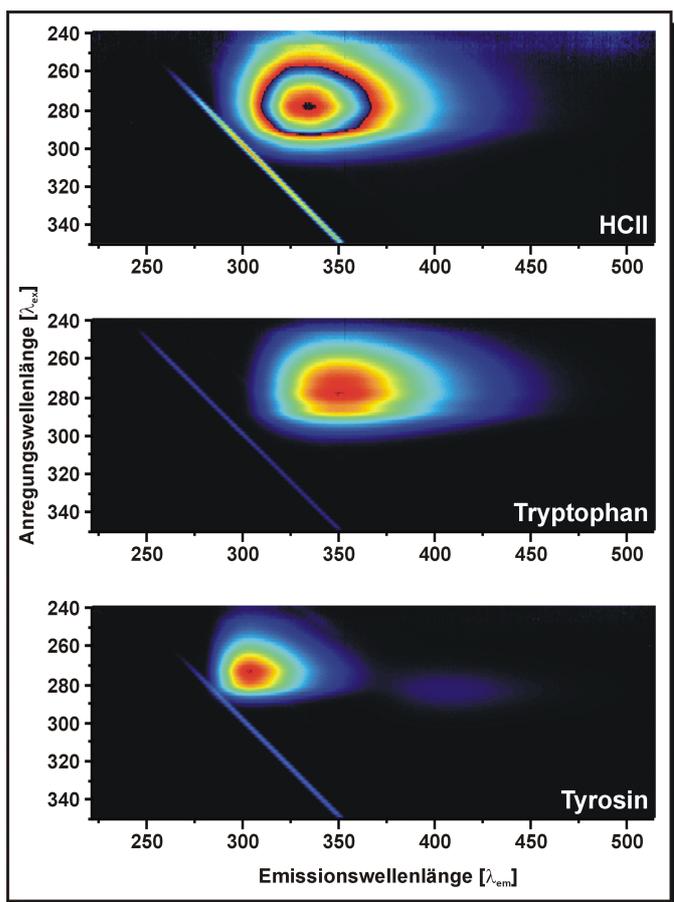
Die fluoreszenzspektroskopischen Messungen von HCII wurden als Anregungs-Emissionsspektroskopie durchgeführt. Der Aufbau der Messapparatur und die Versuchsbedingungen sind in 3.10.5 beschrieben. Die Aufnahme der Anregungs-Emissionsspektren erfolgte über ein zweidimensionales Muster, bei dem die verschiedenen Anregungswellenlängen ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) als Ordinate gegen die zugehörigen Intensitäten der Fluoreszenzemissionen unterschiedlicher Wellenlängen ( $\lambda_{\text{em}}$ ) als Abszisse dargestellt sind. Abbildung 4.4-1 zeigt das AES von HCII im Anregungsbereich von 240 bis 350 nm Wellenlänge und dem Emissionsbereich des fluoreszierten Lichtes von 250 bis 500 nm.

Die Aminosäuresequenz von HCII beinhaltet 4 Tryptophane und 12 Tyrosine<sup>2</sup>. Aus dem Vergleich mit den Spektren der Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin geht hervor, dass die Fluoreszenz von HCII zu großen Teilen auf einer Tryptophanfluoreszenz beruht. Tyrosin zeigt eine maximale Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 274 nm, mit einem Emissionsmaximum bei 303 nm. Hingegen befindet sich das Fluoreszenzmaximum für HCII bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm und einer Emissionswellenlänge von 334 nm. Dies gleicht mehr den Charakteristika der Tryptophanfluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 353 nm). Die ermittelten maximalen Anregungs- und Emissionswellenlängen der HCII-Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ : 334 nm) wurden als Bezugspunkte für nachfolgende spektroskopische Untersuchungen am HCII verwendet.

---

<sup>1</sup> Dafforn *et al.*, 1999; James *et al.*, 1999; Devlin *et al.*, 2002; Tew & Bottomley, 2001

<sup>2</sup> Church *et al.*, 1986; Church *et al.*, 1987; Blinder *et al.*, 1988; Westrup & Ragg, 1994



**Abbildung 4.4-1:** Zweidimensionale Fluoreszenzaufnahmen von HCII, Tryptophan und Tyrosin. Anregungs-Emissionsspektren von HCII (11  $\mu\text{M}$  in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4,  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ ). Die Kontrollspektren der fluorophoren Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin im Anregungsbereich von 240 bis 350 nm und einem Emissionsbereich von 250 bis 500 nm wurden von der Arbeitsgruppe Physikalische Chemie I der Universität Bielefeld zur Verfügung gestellt. Die farbigen Ringe geben die Intensitätszunahme der Fluoreszenz wieder. Die in allen Spektren sichtbare Linie wird durch Rayleigh-Streuung des anregenden Lasers verursacht. Die leichte Verzerrung der Spektren zu längeren Emissionswellenlängen erfolgt durch Raman-Streuung des verwendeten Lösungsmittels ( $\text{H}_2\text{O}$ ).

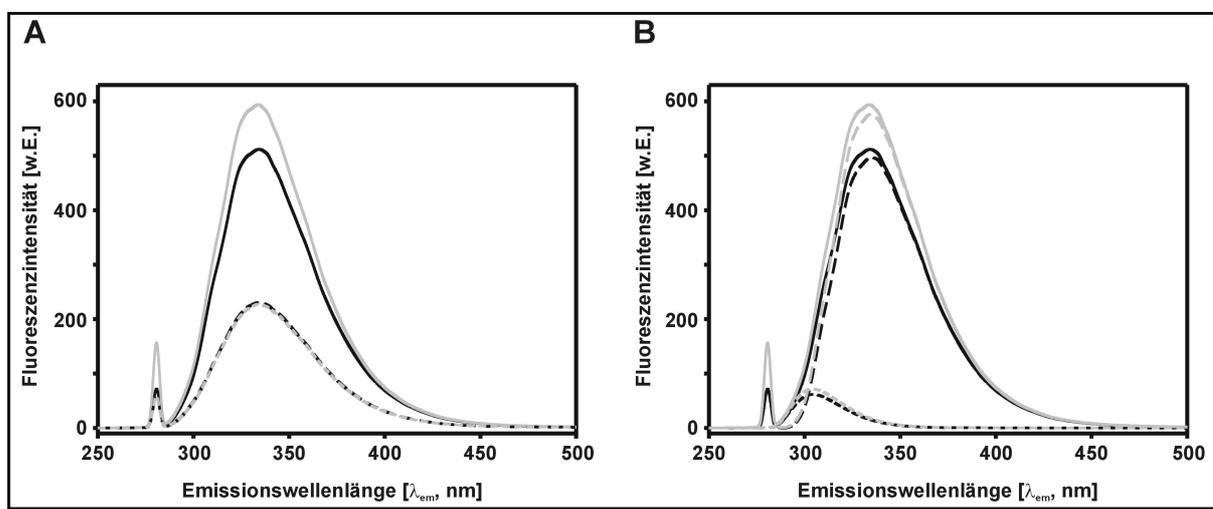
#### 4.4.2 Intrinsische Fluoreszenz von HCII in Gegenwart zweiwertiger Kationen

In Analogie zu den vorherigen Untersuchungen wurde der Einfluss von divalenten Kationen auf die intrinsische Fluoreszenz von HCII analysiert. Es wurden Anregungs-Emissionsspektren von HCII in Gegenwart von je 1 mM  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Ca}^{2+}$  aufgenommen und mit dem Anregungs-Emissionsspektrum von HCII in Abwesenheit divalenter Ionen verglichen. Die Anregungs-Emissionsspektren wurden unter vergleichbaren Bedingungen aufgenommen ( $\lambda_{\text{ex}}$ : 280 nm,  $T = 20\text{ }^\circ\text{C}$ ) und zeigten auch bei dieser Messmethodik, bezüglich der Ionenselektivität den zuvor mit der SPR-Methodik ermittelten Trend. Mangan- und Kalziumionen bewirkten keine Änderung des Fluoreszenzspektrums von HCII. In Intensität und Auflösung waren diese Spektren identisch mit dem von reinem HCII. Nickel- und Zinkionen wirkten sich auf die Intensität des emittierten Lichtes an seinem Emissionsmaximum ( $\lambda_{\text{em}}$ : 334 nm) aus, jedoch in unterschiedlicher Ausprägung (Spektren nicht dargestellt). Der Zuwachs der Fluoreszenzintensität betrug bei Zugabe von Nickelionen 3,1 %, bei Zinkionen jedoch 16 %. Den größten Effekt auf die Fluoreszenz von HCII hatten somit Zinkionen, was bezüglich HCII die Ionenselektivität widerspiegelt, wie sie in dieser Arbeit auch durch andere Methoden ermittelt wurde. Von den untersuchten divalenten Kationen bewirkte lediglich die Bindung von Zinkionen eine wesentliche Beeinflussung der Proteinkonformation von HCII.

#### 4.4.3 Intrinsische Fluoreszenz von HCII und ATIII in Gegenwart von Zinkionen

Die erhöhte intrinsische Fluoreszenz von HCII in Gegenwart von Zinkionen ist die Folge einer spezifischen Bindung der Metallkationen an das Protein, wie vergleichende Untersuchungen mit ATIII belegten. ATIII wurde unter den gleichen Bedingungen wie HCII mit 1 mM  $Zn^{2+}$  versetzt, zeigte aber keine wesentliche Änderung seines Fluoreszenzspektrums (Abbildung 4.4-2, A). Die Intensität verringerte sich in Anwesenheit von Zinkionen um 1,3 % und zeigte damit, verglichen mit HCII, einen gegenläufigen Effekt. ATIII besitzt mit 4 Tryptophan- und 10 Tyrosinresten<sup>1</sup> eine vergleichbare Anzahl von intrinsischen Fluorophoren wie HCII, eine Änderung der Konformation des Proteins durch Bindung von  $Zn^{2+}$  kann für ATIII durch die AES aber nicht belegt werden.

Die Erhöhung der intrinsischen Fluoreszenzintensität bei HCII infolge der Anwesenheit von Zinkionen kann nicht auf eine unspezifische Wechselwirkung zurückgeführt werden, da das verwendete Puffersystem (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4) mit dem zugefügten NaCl eine ausreichende Ionenstärke besitzt um etwaige Ladungswchselwirkungen zwischen den divalenten Kationen und HCII-Oberflächenladungen zu kompensieren. Kontrollexperimente zeigten, dass Zinkionen (1 mM) auch in Gegenwart eines Überschusses von 2 mM  $Ca^{2+}$  eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität von HCII um 16 % bewirkten. Kalziumionen allein zeigten aber keinen Effekt (Ergebnisse nicht dargestellt). Zur kompetitiven Verdrängung von  $Zn^{2+}$  durch andere divalente Kationen kommt es somit nicht.



**Abbildung 4.4-2:** Anregungs-Emissionsspektren von HCII (11  $\mu$ M) und ATIII (4  $\mu$ M).

A: AES von HCII (durchgezogene Linien) und ATIII (unterbrochene Linien) in Abwesenheit (schwarze Kurve) und Anwesenheit (graue Kurve) von 1 mM  $Zn^{2+}$ . Detektion der Emissionsspektren bei der Anregungswellenlänge  $\lambda_{ex} = 280$  nm. Puffersystem 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,4,  $T = 20$  °C.

B: AES von HCII in Abwesenheit (schwarze Kurve) und Anwesenheit (graue Kurve) von 1 mM  $Zn^{2+}$ . Die Gesamtspektren der Fluoreszenzen (durchgezogene Linien) sind aufgeteilt in die Anteile der Tryptophan- (durchgezogene Linien) und Tyrosinfluoreszenz (gepunktete Linien). w.E. = willkürliche Einheit.

<sup>1</sup> Olson & Shore, 1981; Church *et al.*, 1987

Die Zinkionen scheinen spezifisch mit dem Protein zu interagieren. Die Koordination von Zinkionen in Proteinen erfolgt häufig über die Aminosäuren Cystein, Histidin, Glutamat und Aspartat<sup>1</sup>, die bei HCII z.T. auf der Oberfläche exponiert sind<sup>2</sup>. Allgemein wird eine Veränderung des Fluoreszenzspektrums eines Proteins mit induzierten Konformationsänderungen begründet<sup>3</sup>. Die Umgebung der Tryptophangruppen wird durch Bindung eines Kofaktors modifiziert. Die lokale Strukturänderung setzt sich zum Tryptophan hin fort und manifestiert sich in dessen veränderten Fluoreszenzspektrum. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass eine Änderung des Spektrums lediglich durch Störungen der oberflächenexponierten Tryptophangruppen verursacht wird<sup>4</sup>. Solche Störungen führen aber in der Regel eher zu einer Intensitätsverringerung des Spektrums durch Fluoreszenzauslöschung.

Die Wirkung der Zinkionen auf das HCII-Fluoreszenzspektrum war auf eine Erhöhung der Intensität am Emissionsmaximum ( $\lambda_{em}$ : 334 nm) beschränkt. Eine Verschiebung des Emissionsspektrums zu höheren oder niedrigeren Wellenlängen war nicht zu beobachten. Eine solche Verlagerung des Emissionsmaximums wäre ein Indiz für die Änderung der Hydrophobizität/Hydrophilizität in der Umgebung der fluorophoren Gruppen infolge konformativer Änderungen des Proteins. Von den vier Tryptophangruppen befinden sich zwei Gruppen in hydrophiler Umgebung in der N-terminalen Domäne von HCII, wie aus Kombination von Literaturdaten<sup>5</sup> zu folgern ist. Diese Gruppen scheinen keine Hydrophobizitätsänderung in ihrer Umgebung zu erfahren. Auch die Zusammensetzung des Emissionsspektrums von HCII ändert sich bei Zugabe von 1 mM  $Zn^{2+}$  nicht. Abbildung 4.4-2, B zeigt das Anregungs-Emissionsspektrum von HCII in Abwesenheit und Anwesenheit von 1 mM  $Zn^{2+}$ , separiert in die Anteile der Tryptophan- und Tyrosinfluoreszenz. Die Teilfluoreszenzen nehmen wie die Gesamtfluoreszenz, bei Zugabe von  $Zn^{2+}$  um je 16 % an Intensität zu. Ein veränderter Transfer an Fluoreszenzenergie zwischen den beiden Fluorophoren scheint nicht stattzufinden. Die durch Zinkionen verursachte Konformationsänderung am HCII wirkt sich nur in der absoluten Fluoreszenzintensität aus, wie es auch bei anderen Proteinwechselwirkungen mit Kofaktoren beobachtet wurde<sup>6</sup>.

---

<sup>1</sup> Vallee & Falchuk, 1993; Alberts *et al.*, 1998

<sup>2</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>3</sup> Einarsson & Andersson, 1977; Nordenman & Björk, 1978

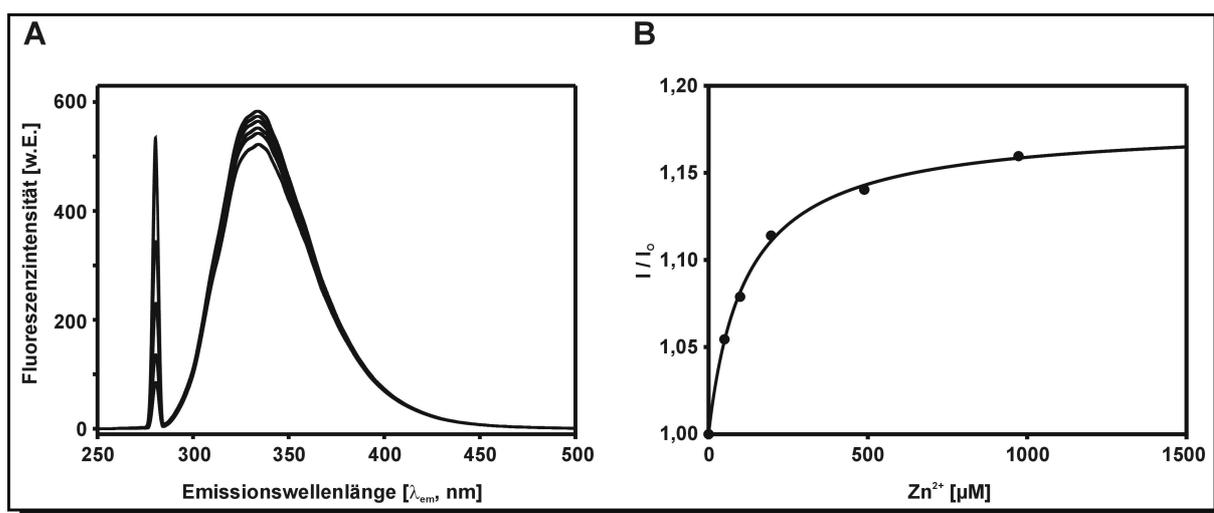
<sup>4</sup> Nordenman *et al.*, 1978

<sup>5</sup> Church *et al.*, 1985; Church *et al.*, 1987; Baglin *et al.*, 2002

<sup>6</sup> Tanyi *et al.*, 1995; Chakraborty *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2001; Desai *et al.*, 2002; Permyakov *et al.*, 2002; Stray *et al.*, 2004

#### 4.4.4 Quantitative Bestimmung der HCII/Zink-Interaktion

Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität von HCII in Gegenwart von Zinkionen wurde im vorherigen Abschnitt als spezifischer Effekt infolge von Konformationsänderungen am Protein interpretiert. Diese Spezifität wurde nachfolgend weiter untersucht. Die Kationenbindestellen am Protein sollten bei hoher Zinkkonzentration der Probe eine Sättigung erfahren und die Interaktion sollte quantifiziert werden. Dazu wurde HCII mit steigenden Konzentrationen an  $\text{ZnCl}_2$  versetzt und die Fluoreszenzbestimmung wie unter 3.10.5.2 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis dieser Titrationsreihe ist in Abbildung 4.4-3 dargestellt.



**Abbildung 4.4-3:** Veränderung der intrinsischen Fluoreszenz von HCII in Abhängigkeit der  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration. A: Titration von HCII (11  $\mu\text{M}$ ) mit ansteigenden  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen (von unten nach oben: 0, 50, 100, 200, 500, 1000  $\mu\text{M}$ ).  $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ . w.E. = willkürliche Einheit. B: Darstellung des Verhältnisses der maximalen Fluoreszenzintensität ( $I/I_0$ ) von HCII in Abhängigkeit der  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentration ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 334 \text{ nm}$ ).

In Bild A ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Zinkkonzentration zu erkennen. Bild B stellt das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten ( $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 334 \text{ nm}$ ) in Abhängigkeit von der Zinkionenkonzentration dar. Der dargestellte Fit durch die Messdaten hat die Form einer Hyperbel mit einer Sättigung bei höheren  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen. Die iterative Anpassung an die Gleichung 10 (siehe 3.10.5.2) wurde mit dem Programm TableCurve 2D<sup>®</sup> (Version 5.01, SYSTAT Software) vorgenommen und lieferte die Dissoziationskonstante <sup>1</sup> der HCII/ $\text{Zn}^{2+}$ -Interaktion (Tabelle 4.4-1).

<sup>1</sup> Boskovic *et al.*, 1990; Fredenburgh *et al.*, 1997

**Tabelle 4.4-1:** Dissoziationskonstante der HCII/Zn<sup>2+</sup>-Interaktion

Protein	$\alpha$	$K_d$ [ $\mu$ M]	$R^2$	$P$
HCII	$0,18 \pm 0,07$	$123 \pm 36$	0,9985	0,04

Bestimmung der Fluoreszenzkonstanten  $\alpha$  und der Dissoziationskonstanten  $K_d$  durch nicht lineare Regression.  $R^2$  ist ein Maß für die Qualität der mathematischen Anpassung an die experimentellen Daten.  $P$  beschreibt die Signifikanz der Messdaten bezüglich der Abweichung von der Regression ( $P < 0,05$ ).

Die ermittelte Stabilitätskonstante  $K_d$  ist mit 123  $\mu$ M ein Beleg für eine mittelstarke Interaktion von Zn<sup>2+</sup> und HCII. Ein Vergleich mit Stabilitätskonstanten der in der Literatur beschriebenen Zink-bindenden Proteinen ist nur unter Einschränkungen möglich. Die verwendeten Methoden sind unterschiedlich und ihre Durchführungen nicht einheitlich. In Tabelle Tabelle 4.4-2 sind einige Proteine aufgeführt, bei denen eine Zinkbindung vermutet wird und für die Dissoziationskonstanten bestimmt wurden.

**Tabelle 4.4-2:** Literaturdaten von Dissoziationskonstanten für Zn<sup>2+</sup>/Protein-Interaktionen

Protein	$K_d$ [ $\mu$ M]	Referenz
$\alpha$ -Sarcin	900	Martinez del Pozo <i>et al.</i> , 1989
Calsequestrin	300	Baksh <i>et al.</i> , 1995
Calregulin	310	Khanna <i>et al.</i> , 1986
Faktor XII	91	Bernardo <i>et al.</i> , 1993
	0,6	Røjkjær & Schousboe, 1997
Prothymosin $\alpha$	40	Chichkova <i>et al.</i> , 2000
Parathymosin $\alpha$	6	Brand <i>et al.</i> , 1988
rec. Decorin	3,9	Yang <i>et al.</i> , 1999
$\beta$ A4 Amyloid-Protein-Precursor	0,7	Bush <i>et al.</i> , 1993

Die in Tabelle Tabelle 4.4-2 aufgeführten Dissoziationskonstanten zeigen ein Größenspektrum, welches auch die in dieser Arbeit ermittelte Konstante der HCII/Zn<sup>2+</sup>-Interaktion umfasst. Der Vergleich kann nur qualitativ erfolgen, da die Literaturdaten häufig unter geringen Ionenstärken bestimmt wurden. Die Ionenstärke des verwendeten Puffersystem hat aber einen großen Einfluss auf die ermittelte Dissoziationskonstante. Von den dargestellten Literaturdaten sind vor allem die Dissoziationskonstanten von Parathymosin  $\alpha$  und Prothymosin  $\alpha$  von Interesse. Für diese beiden Proteine ist die Bindung von Zinkionen durch Cluster von sauren Aminosäuren (Asp, Glu) belegt. Diese Cluster besitzen Ähnlichkeiten mit den beiden sauren Domänen im N-Terminus (Abbildung 2.2-2) von HCII, über welche eine Zinkbindung realisiert sein könnte.

## 4.5 Einfluss von Zinkionen auf die Kinetik der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin

Die bisher in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen analysierten die Interaktionen von HCII und Heparin unter dem Einfluss von Zinkionen sowie die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$  durch HCII. Eine wesentliche Funktion von HCII stellt die Komplexierung (bzw. Hemmung) von  $\alpha$ -Thrombin dar, welche durch Glykosaminoglykane wie Heparin beschleunigt wird. Eine mögliche Beeinflussung der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch Zinkionen ist nachfolgend beschrieben.

### 4.5.1 Bestimmung von Reaktionskonstanten der Hemmung von $\alpha$ -Thrombin

Die Charakterisierung der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin erfolgte über die Reaktionsgeschwindigkeit als quantitative Bestimmung der Konstanten  $k_2$ . Die Hemmung von Serinproteasen durch Serpine ist ein mehrstufiger Prozess mit strukturellen Änderungen am Enzym wie am Inhibitor (2.1.2). Zur Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten wird zur Vereinfachung von einer Reaktionsordnung zweiten Grades ausgegangen (siehe 3.10.6).

Der Einfluss von Zinkionen auf die Kinetik der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin wurde in Komplexierungsreaktionen von HCII und ATIII mit unterschiedlichen Konzentrationen des divalenten Kations durchgeführt, sowohl in Anwesenheit und Abwesenheit von Heparin. ATIII diente in den Versuchen als Kontrollprotein, da das Enzym in den vorherigen Untersuchungen keine Beeinflussung durch Zinkionen zeigte.

**Tabelle 4.5-1:** Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII und ATIII

Serpin	ohne $\text{Zn}^{2+}$	15 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	50 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$	100 $\mu\text{M}$ $\text{Zn}^{2+}$
	$k_2$ [ $\text{M}^{-1} \text{min}^{-1}$ ] <sup>a</sup>			
HCII	$2,2 \pm 0,2 \times 10^5$	$2,0 \pm 0,3 \times 10^5$	$1,9 \pm 0,4 \times 10^5$	$1,5 \pm 0,4 \times 10^5$
HCII/Heparin	$1,5 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,2 \pm 0,2 \times 10^8$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^8$	$0,9 \pm 0,1 \times 10^8$
ATIII	$2,4 \pm 0,2 \times 10^5$	$2,5 \pm 0,3 \times 10^5$	$2,7 \pm 0,4 \times 10^5$	$2,2 \pm 0,4 \times 10^5$
ATIII/Heparin	$0,9 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,1 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,1 \pm 0,1 \times 10^8$	$0,9 \pm 0,1 \times 10^8$

Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin (9,17 nM) durch HCII oder ATIII (je 100 nM) unter dem Einfluss von Heparin (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 175 Units/mg) und  $\text{Zn}^{2+}$ . Quantitative Bestimmung der Hemmung (Inhibitionskonstante  $k_2$ ) bei unterschiedlichen  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4.  
<sup>a</sup> Die dargestellten Inhibitionskonstanten sind Mittelwerte mit mittlerer Standardabweichung aus 3 bis 8 unabhängigen Messreihen.

Tabelle 4.5-1 zeigt die ermittelten Inhibitionskonstanten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII und ATIII unter dem Einfluss von Zinkionen im Konzentrationsbereich zwischen 0 und 100  $\mu\text{M}$ . Die Reaktionen wurden sowohl in Abwesenheit und Anwesenheit von Heparin durchgeführt. Den Inhibitionskonstanten ist zu entnehmen, dass die Geschwindigkeit der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII mit zunehmender Zinkionenkonzentration geringfügig abnahm. Dies galt unter beiden Versuchsbedingungen, sowohl mit als auch ohne Heparin im Reaktionsansatz. Die Intensität der prozentualen Abnahme war in beiden Fällen vergleichbar (30-40 % bei 100  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$ ). Vergleichende Analysen der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin mit ATIII belegten hingegen in Übereinstimmung mit Literaturdaten<sup>1</sup> keinen Einfluss von Zinkionen auf die Reaktionsgeschwindigkeiten. In dem gesamten untersuchten Konzentrationsbereich wiesen die Inhibitionskonstanten von ATIII nur Schwankungen innerhalb des Fehlerbereichs auf.

Für Serpin-Protease-Reaktionen sind Inhibitionskonstanten ( $k_2$ ) mit Werten zwischen  $10^3$  bis  $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  bekannt<sup>2</sup>. Die ermittelten Reaktionsgeschwindigkeiten in Abwesenheit von Zinkionen entsprachen für HCII und ATIII den bekannten Literaturdaten (Tabelle 4.5-2), sowohl in Gegenwart wie auch in Abwesenheit von Heparin. Geringe Unterschiede zu den hier ermittelten Daten sind durch Variationen der Versuchsbedingungen, wie Temperatur, Ionenstärke, Puffersystem und spezifische Aktivität des Heparins zu erklären.

**Tabelle 4.5-2:** Literaturdaten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII und ATIII

Serpin	$k_2$ [ $\text{M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]	Referenz
HCII	$1,4 \times 10^5$	Hayakawa <i>et al.</i> , 2000 <sup>a</sup>
	$5,0 \times 10^5$	Tollefsen <i>et al.</i> , 1982
HCII/Heparin	$2,4 \times 10^8$	Becker <i>et al.</i> , 1999
	$1,6 \times 10^8$	Jeter <i>et al.</i> , 2004
ATIII	$2,2 \times 10^5$	Jeter <i>et al.</i> , 2004
	$4,5 \times 10^5$	Tollefsen <i>et al.</i> , 1982
ATIII/Heparin	$3,0 \times 10^8$	Becker <i>et al.</i> , 1999
	$2,0 \times 10^8$	Jeter <i>et al.</i> , 2004

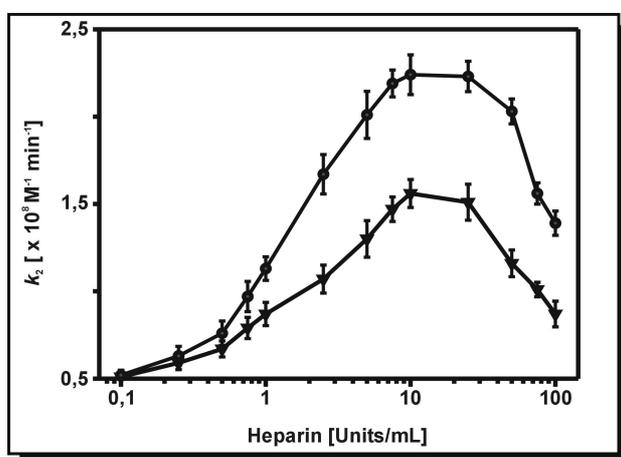
Mittels Kontrollexperimenten konnte belegt werden, dass in Gegenwart von EDTA (1 mM) in Kombination mit  $\text{Zn}^{2+}$  (0 bis 100  $\mu\text{M}$ ) keine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit stattfindet. Auch verursachten Kalziumionen im gleichen Konzentrationsbereich keine Beeinflussung der Inhibitionsreaktion, noch waren die Kalziumionen in der Lage, die Wirkung der Zinkionen zu kompensieren. Beide Kontrollexperimente belegen einen spezifischen Einfluss der Zinkionen auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII.

Eine Erklärungsmöglichkeit für das ermittelte Ergebnis ist, dass Zinkionen die Affinität von HCII zu Heparin verändern und so bei der verwendeten Heparinkonzentration eine verringerte

<sup>1</sup> Lin *et al.*, 2000

<sup>2</sup> Gettins, 2002<sup>a</sup>

Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt wurde. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII in Abhängigkeit von Zinkionen wurde nachfolgend bei verschiedenen Heparinkonzentrationen untersucht, um die Heparinkonzentration zu bestimmen, bei der die maximale Hemmung auftritt. In Abbildung 4.5-1 ist ein Plot der Inhibitionskonstanten in Abhängigkeit der entsprechenden Heparinkonzentration dargestellt. Daraus ist zu entnehmen, dass bei Anwesenheit von Zinkionen die erreichten Reaktionsgeschwindigkeiten bei allen Heparinkonzentrationen um ca. 30 % verringert waren. Die maximale Inhibitionskonstante wurde bei 10 Units/mL erreicht, unabhängig von der Gegenwart von Zinkionen im Reaktionsansatz. Eine Verschiebung der maximalen Inhibitionskonstante zu abweichenden Heparinkonzentrationen unter den Einfluss von Zinkionen konnte somit nicht beobachtet werden.



**Abbildung 4.5-1:** Heparin-induzierte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin (10 nM) durch HCII (100 nM) in Abwesenheit (●) oder Anwesenheit (▼) von 50  $\mu\text{M}$   $\text{Zn}^{2+}$  in 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 g/L PEG 8000, pH 7,4. Durchführung der Inhibitionsreaktion mit unterschiedlichen Konzentrationen an Heparin (175 USP Units/mg), wie unter 3.10.6.2 beschrieben. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus je zwei separaten Messreihen mit Datenpunkten aus Dreifachmessungen. Die Fehlerbalken präsentieren den mittleren Standardfehler.

#### 4.5.2 Bestimmung des SI-Wertes der HCII/ $\alpha$ -Thrombininhibition

Eine weitere Charakterisierung der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII kann durch die Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) erfolgen. Der SI-Wert ist ein Maß für das Verhältnis zwischen dem inhibitorischen- und dem Substratpfad des Reaktionsmechanismus bei der Wechselwirkung von Serinprotease und Serpin (siehe 2.1.3). Der Einfluss von Zinkionen auf die Stöchiometrie der Inhibition von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von Heparin ermittelt. Die Ergebnisse sind nachfolgend (Tabelle 4.5-3) dargestellt.

**Tabelle 4.5-3:** SI-Werte der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII

	- Zn <sup>2+</sup>	50 $\mu$ M Zn <sup>2+</sup>
HCII	5,9 $\pm$ 1,3	10,3 $\pm$ 4,6
HCII/Heparin	1,8 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 1,4

Bestimmung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) unter dem Einfluss von Zn<sup>2+</sup>, in Anwesenheit und Abwesenheit von Heparin (10  $\mu$ g/mL, 175 USP Units/mg) Ermittlung der SI-Werte aus dem linearen Fit der  $\alpha$ -Thrombin-Restaktivität, wie unter 3.10.9 beschrieben. Die dargestellten SI-Werte sind Mittelwerte mit mittlerer Standardabweichung aus 4 unabhängigen Messungen.

Die SI-Werte in Abwesenheit von Zinkionen stimmten mit Literaturdaten überein, die für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII in Abwesenheit und Anwesenheit von Heparin bestimmt wurden (SI: 1,8 bzw.  $\sim$ 7)<sup>1</sup>. Die ermittelten Daten belegten eine Änderung der SI-Werte unter dem Einfluss von Zinkionen. Sowohl bei der Heparin-beschleunigten Reaktion, als auch bei der nicht aktivierten Inhibition, wurde ein größerer SI-Wert in Gegenwart von 50  $\mu$ M Zn<sup>2+</sup> erhalten als ohne das divalente Kation. Der größere SI-Wert bei Gegenwart von Zinkionen bedeutet ein geändertes Reaktionsverhalten des Serpins, welches weniger inhibitorisch und mehr als Substrat fungiert. Die gesteigerten Substrateigenschaften von HCII erklären auch die verringerte Inhibitionskonstante ( $k_2$ ) der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Zinkionen (Tabelle 4.5-1). Über den Substratpfad kommt es zur Bildung von inaktivem Serpin, die Protease  $\alpha$ -Thrombin bleibt aber aktiv und kann an weiteren Reaktionen teilnehmen. In dieser Arbeit erfolgte die Bestimmung der Inhibitionskonstante über die Restaktivität von  $\alpha$ -Thrombin in den Komplexierungsansätzen. Durch diese Messmethodik wird somit bei höheren SI-Werten eine kleinere Inhibitionskonstante ermittelt als tatsächlich vorliegt.

<sup>1</sup> Ciaccia *et al.*, 1997

## Untersuchungen zur Bedeutung der N-terminalen Domäne von HCII

Für die Reaktivität von HCII gegenüber der Protease  $\alpha$ -Thrombin ist die N-terminale Domäne von HCII von zentraler Bedeutung. Die Lokalisation dieser Domäne in der Struktur von nativen HCII ist nicht genau bekannt (2.2.3). Um den Mechanismus der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII und die Position des N-Terminus näher zu charakterisieren, wurden im Rahmen der Dissertation von S. Brinkmeyer<sup>1</sup> HCII-Varianten mit dem Ziel konstruiert, den N-Terminus von HCII an verschiedenen Positionen des Proteins über eine reduzierbare Disulfidbrücke zu fixieren. Dazu wurden Cysteine an drei verschiedenen Stellen im N-Terminus von HCII sowie an Position 195 eingeführt, um zwischen diesen eine kovalente Verknüpfung zu ermöglichen. Um eine Reaktion zwischen den natürlichen und den durch Mutation eingefügten Cysteinen zu verhindern, wurden die natürlichen Cysteine des HCII jeweils durch Serine ersetzt (betreffend der Überlegungen zur Einführung der Mutationen siehe S. Brinkmeyer, 2001). In dieser Arbeit wurden die erzeugten Genvarianten in Expressionsvektoren überführt (4.7), die rekombinanten Proteine in transfizierten CHO-Zellkulturen exprimiert (4.8.1), aufgereinigt (4.8.3), bezüglich ihres Reaktionsverhaltens analysiert (4.9) und durch kinetische Messungen charakterisiert (4.10).

## 4.6 Darstellung einer Anti-HCII-Affinitätsmatrix

Die Reinigung rekombinanter HCII-Varianten aus Zellkulturüberständen (siehe 4.8.3) konnte nicht mit der zuvor beschriebenen Methode (4.1) erfolgen. Diese Methodik beinhaltete unter anderem eine Chromatographie an Heparin-Sepharose zur Reinigung und Konzentration von HCII. Die rHCII-Varianten besaßen aber zum Teil eine stark verringerte Heparinaffinität, wodurch eine effektive Reinigung an Heparin-Sepharose erschwert worden wäre. Daher musste eine andere, für alle Varianten einheitliche Reinigungsmethodik verwendet werden. Eine Isolierung von HCII an einer Immunaффinitätsmatrix ist bereits beschreiben<sup>2</sup>. Die beschriebene Methode wurde in dieser Arbeit durch Verwendung von Antigen-gereinigten Antikörpern und deren chemischer Kopplung an einer STREAMLINE™ rProtein A Sepharose™ zur Erstellung einer Immunaффinitätsmatrix verbessert. Die spezifischen Immunglobuline aus einem polyklonalen Anti-HCII-Kaninchenserum wurden über eine HCII-Affinitätsmatrix (Antigen-Affinitätsmatrix) isoliert. Diese HCII-Affinitätsmatrix wurde im Rahmen einer Diplomarbeit<sup>3</sup> aus biotinyliertem HCII an einer Streptavidin-Agarosematrix erstellt.

---

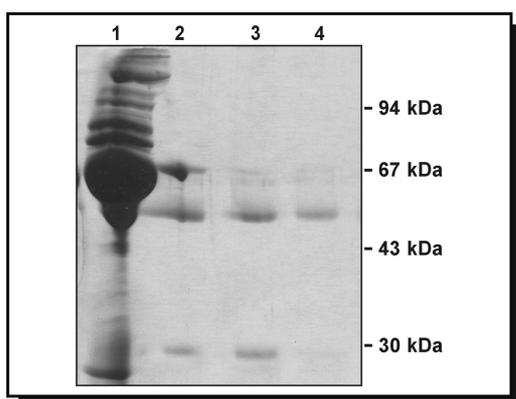
<sup>1</sup> Brinkmeyer, 2001

<sup>2</sup> Liaw *et al.*, 1999

<sup>3</sup> Komyod, 2001

#### 4.6.1 Isolierung und Reinigung von Anti-HCII-Immunglobulinen aus Serum

Das verwendete Kaninchenserum zeichnete sich durch eine hohe Spezifität gegenüber HCII aus und zeigte in Western-Blots keine Reaktion gegenüber anderen Proteinen aus humanem Plasma oder den Medienbestandteilen einer Zellkultivierung. Mit diesen Anti-HCII Immunglobulinen sollte eine Immunaффinitätsmatrix erstellt werden. Die Immunglobuline wurden zuvor von den anderen Serumbestandteilen isoliert. Um die gegen HCII gerichteten Antikörper von den anderen Immunglobulinen des Serums zu trennen, wurde eine Antigen-spezifische Reinigung durchgeführt. Es wurde eine selbst hergestellte HCII-Aффinitätsmatrix verwendet, um durch chromatographische Verfahren die spezifischen Antikörper zu separieren (siehe 3.8.1). Die Elution erfolgte mit dem Puffer *ImmunoPure<sup>®</sup> Gentle Elution Buffer Ag/Ab* (Pierce), welcher die Antikörper unter milden Bedingungen von den Antigenen löst, da auch die zu reinigenden HCII-Varianten unter den milden Bedingungen des *Gentle Elution Buffer* eluiert werden sollten. Immunoglobuline mit hoher Affinität zu ihrem Antigen wurden durch stringendere Bedingungen mit einem Regenerationspuffer (0,1 M Glycin, pH 3,0) in einer weiteren Fraktion nachfolgend eluiert, aber nicht zur Darstellung der Immunaффinitätsmatrix verwendet.



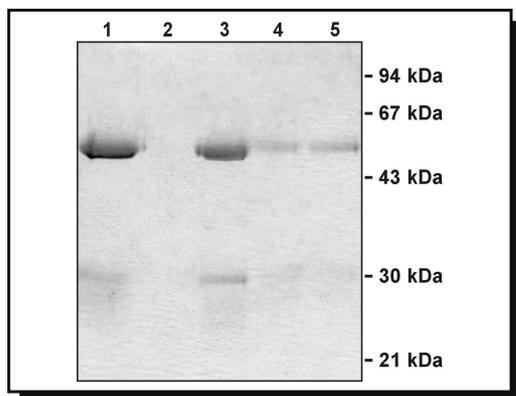
**Abbildung 4.6-1:** Reduzierende SDS-PAGE (10 % Tris/Glycin) und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung (siehe 3.4.2) zum Nachweis der chromatographischen Reinigung der Anti-HCII-Antikörper aus Kaninchenserum. Dargestellt sind das Serum vor der chromatographischen Trennung (Spur 1), Eluatfraktionen mit dem *ImmunoPure<sup>®</sup> Gentle Elution Buffer Ag/Ab* (Spuren 2 und 3), sowie dem Regenerationspuffer (0,1 M Glycin, pH 3,0) in Spur 3. Zu erkennen sind schwere (ca. 50 kDa) und leichte Kette (ca. 25 kDa) der gereinigten Immunglobuline.

Abbildung 4.6-1 zeigt das Ergebnis der Antigen-spezifischen Reinigung nach Analyse in einem reduzierenden SDS-Gel. In Spur 1 ist das verdünnte Kaninchenserum vor der Reinigung dargestellt. Unter der Vielzahl verschiedener Proteine ist besonders Albumin zu erkennen, das den Großteil am detektierten Gesamtprotein ausmacht. In den Spuren 2 und 3 sind Fraktionen des Eluats (*ImmunoPure<sup>®</sup> Gentle Elution Buffer Ag/Ab*) abgebildet. Unter den reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE sind in den Eluaten die schwere und die leichte Kette der Immunglobuline zu identifizieren. Die zur Reinigung verwendete Matrix bestand aus HCII, Biotin und Streptavidin (siehe 4.6), was zu unspezifischen Bindungen von Proteinen des Kaninchenserums hätte führen können. Neben den Immunglobulinen enthält das Eluat aber keine sichtbaren Verunreinigungen. Unter den verwendeten Bedingungen der Reinigung besitzt die verwendete Matrix eine hohe Spezifität.

Eine nähere Charakterisierung der Antikörper aus den Eluaten erfolgte über einen modifizierten ELISA (3.4.1.1) mit den gereinigten Immunglobulinen als Fangantikörper. Dadurch konnte belegt werden, dass die eluierten Antikörper HCII-spezifisch sind. Zudem konnte eine relative Bestimmung der Immunglobulin-Konzentration in den Fraktionen der chromatographischen Reinigung vorgenommen werden. In Bezug auf die Menge der HCII-Antikörper im Kaninchenserum vor der Reinigung (gleich 100 %), befanden sich im Durchlauf der Reinigung 7,4 % der Immunglobuline, im Eluat 74 % und im Regenerationspuffer 17 % der Immunglobuline. Für weitere Anwendungen wurde die Antikörperlösung weiter konzentriert (Microsep™ Mikrokonzentratoren). Die Mengenbestimmung der Immunglobuline erfolgte durch densitometrische Analyse der Banden in einem SDS-Gel. Insgesamt wurden aus 6 mL Kaninchenserum ca. 3 mg Anti-human-HCII-Antikörper isoliert.

#### 4.6.2 Immobilisierung und Kopplung der Anti-HCII-Antikörper an rProtein A

Die Immobilisierung der gereinigten Antikörper wurde durch Bindung an STREAMLINE™ rProtein A Sepharose™ erreicht. Diese Matrix mit konjugiertem rekombinanten Protein A aus *Staphylococcus aureus* (siehe 3.5.1.1) bindet Immunglobuline über deren F<sub>c</sub>-Region. Die gerichtete Orientierung positioniert die Antikörper für eine ungehinderte Bindung der Antigene über die variablen Bereiche der Immunglobuline. Nach der Immobilisierung wurden die Antikörper mittels DMP (Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid) kovalent an die Matrix gekoppelt (siehe 3.8.2).



**Abbildung 4.6-2:** Kontrolle der Immobilisierung und chemischen Kopplung der Anti-HCII-Antikörper an rProtein A Sepharose™. Proben der einzelnen Immobilisierungsstufen wurden in reduzierendem Probenpuffer denaturiert und der Überstand durch Coomassie-Blau-Färbung nach SDS-PAGE analysiert.

Spur 1 : Antikörper-Lösung vor Immobilisierung an rProtein A

Spur 2: Überstand nach der Immobilisierung der Antikörper und vor der chemischen Kopplung mit DMP

Spur 3: rProtein A Matrix nach der Immobilisierung der Antikörper und vor der chemischen Kopplung mit DMP

Spur 4: Überstand nach der chemischen Kopplung der Antikörper mit DMP in *ImmunoPure® Gentle Elution Buffer* Ag/Ab

Spur 5: Spur 4: Überstand nach der chemischen Kopplung der Antikörper mit DMP in 0,1 M Glycin, pH 3,0

Eine Analyse der Antikörper-Immobilisierung und der chemischen Kopplung ist in Abbildung 4.6-2 dargestellt. Durch Denaturierung mit reduzierendem Probenpuffer wurden nicht kovalent gebundene Proteine von den Beads eluiert. In Spur 1 ist die Antikörperlösung vor der Immobilisierung dargestellt. Spur 2 zeigt diese Lösung nach Kontakt mit der rProtein A Matrix. Antikörper sind nicht mehr zu detektieren und scheinen nahezu quantitativ an der

Matrix gebunden zu sein. Wie Spur 3 belegt, waren die Antikörper an die Matrix assoziiert und konnte nach der chemischen Kopplung mit dem Reagenz DMP nicht mehr von dieser eluiert werden (Spuren 4 und 5). Densitometrische Auswertung der Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung ergab, dass etwa 80 % der eingesetzten Antikörper kovalent an die rProtein A Matrix gebunden waren.

## 4.7 Plasmidkonstruktionen für die eukaryotische Expression

HCII-Varianten waren bereits im Rahmen der Dissertation von S. Brinkmeyer<sup>1</sup> durch PCR-Mutagenese hergestellt worden. Die für diese HCII-Varianten kodierenden cDNAs lagen jeweils in dem Shuttle-Vektor pCDM8 vor. Alle Inserts waren durch Sequenzierung charakterisiert. Bei allen Plasmiden handelte es sich um Derivate des Vektors pWTBiI (für eine Übersicht der Nukleotid- und Aminosäureänderungen der Varianten siehe Tabelle 3.2-5). Zur stabilen Expression der Varianten in CHO-Zellkulturen mussten die für die HCII-Varianten kodierenden cDNAs in den Vektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) überführt werden (siehe 3.2.7). Die Vorgehensweise war für alle sechs untersuchten HCII-Varianten identisch. Die Ergebnisse sind im Nachfolgenden beschrieben und exemplarisch am Beispiel der Cystein-freien Variante pHCIIDeltaC dargestellt.

### 4.7.1 Konstruktion von Expressionsplasmiden

Als Expressionsplasmide wurden die Varianten pHCIIF195C, pHCIIDeltaC, pHCIIDeltaC/F195C, pHCIIDeltaC/F195C/P52C, pHCIIDeltaC/F195C/G54C und pHCIIDeltaC/F195C/S68C wie unter 3.2.7 beschrieben konstruiert. Als Ausgangsvektoren wurden Plasmide verwendet, die bereits die für die entsprechende HCII-Variante kodierende cDNA enthielten<sup>1</sup>. Diese Plasmide waren alle Derivate des Plasmids pWTBiI<sup>2</sup>, welches in der *SacI*-Schnittstelle des Shuttle-Vektors pCDM8, die HCII-cDNA in der korrekten Orientierung enthielt. Die jeweils für die Varianten kodierende cDNAs wurden als 1,6 kB *EcoRI*-Fragment aus den Shuttle-Vektoren isoliert. Die zwei *EcoRI*-Spaltstellen liegen im 5'- bzw. im 3'-nichtkodierenden Bereich der cDNA, so dass die für die HCII-Varianten kodierenden Bereiche vollständig in die singuläre *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors pcDNA3.1(+) ligiert werden konnten. Nachfolgend wurde mit den Ligationsprodukten eine Transformation von Epicurian coli XL-1 Blue MRF' Kan durchgeführt, und die Transformanten durch Plasmid-Schnell-Charakterisierung untersucht, bei der die zirkuläre DNA durch Agarosegelelektrophorese analysiert wird (siehe 3.2.2.1)<sup>3</sup>. Das Ergebnis einer solchen Charakterisierung ist exemplarisch am Beispiel der Cystein-freien

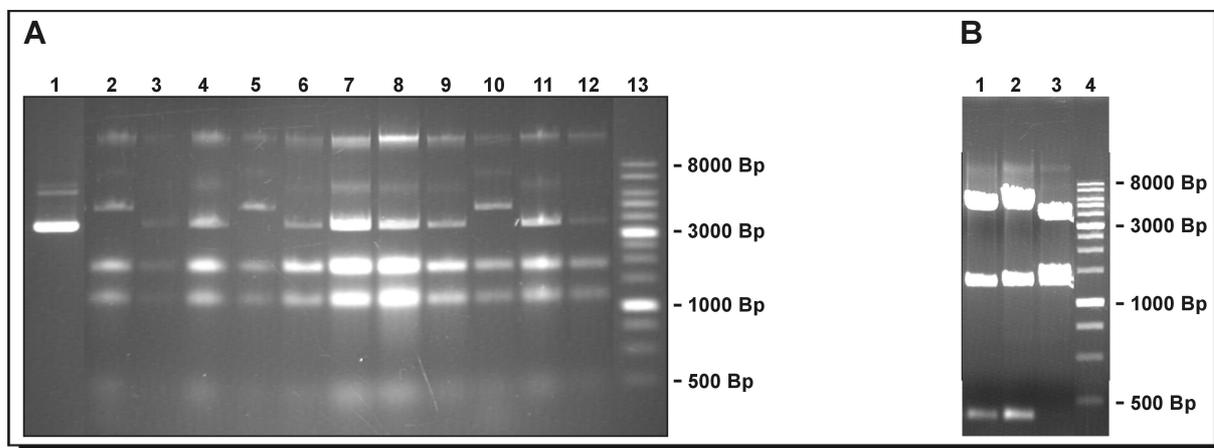
---

<sup>1</sup> Brinkmeyer, 2001

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>

<sup>3</sup> Davis *et al.*, 1999; Barnes, 1977

Variante pHCI $\Delta$ C in Abbildung 4.7-1, A dargestellt. Spur 1 zeigt den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) ohne HCII-cDNA und fungiert als Negativkontrolle. Lediglich in den Spuren 2, 5 und 10 ist eine Plasmidbande mit geringerer Mobilität zu erkennen, was auf eine erfolgreiche Ligation eines Inserts in den Expressionsvektor schließen lässt.



**Abbildung 4.7-1:** Kontrolle und Charakterisierung der Ligationsprodukte aus HCII-cDNA und pcDNA3.1(+)  
 A: Plasmid-Schnell-Charakterisierung (3.2.2.1) der transformierten Bakterienstämme XL-1 Blue MRF' Kan (0,7 % Agarosegel). Spur 1, Negativkontrolle mit Vektor pcDNA3.1(+); Spuren 2 bis 12, Produkte transformierter Bakterienstämme; Spur 13, 1 kb DNA-Größenstandard.  
 B: Restriktionsanalyse der Plasmide mit der Endonuklease *PstI* (1 % Agarosegel). Die Spuren 1-3 entsprechen den Spuren 2, 5 und 10 aus Bild A; Spur 4, 1 kb DNA-Größenstandard.

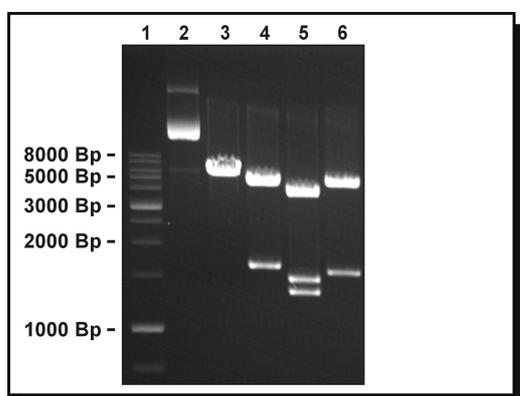
Die drei Vektorkonstrukte wurden weiter charakterisiert. Bei Restriktion mit *PstI* sollten nach Insertion eines 1,6 kb-Fragmentes in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) und korrekter Orientierung drei DNA-Fragmente mit Größen von 1356, 1506 und 4247 Bp gebildet werden. Dies war nur bei einem der drei Ligationsprodukte der Fall. In Spur 3 (Abbildung 4.7-1, Bild B) sind DNA-Fragmente der erwarteten Größen zu erkennen.

Dieses untersuchte Ligationsprodukt entspricht dem in Spur 10 von Bild A dargestellten Konstrukt. Das Plasmid wurde mittels Restriktionsspaltungen hinsichtlich Größe des Vektors, Größe des Inserts und dessen Orientierung weiter untersucht. Die nachfolgende Tabelle zeigt die entstehenden Fragmentgrößen bei korrekter Orientierung des Inserts, die zugehörigen Restriktionsspaltungen des Expressionsvektors pHCI $\Delta$ C sind in Abbildung 4.7-2 angegeben.

**Tabelle 4.7-1:** Charakterisierende Restriktionsspaltung des Expressionsplasmids pHCIIC ΔC

Endonuklease	Schnittpositionen [nach Bp]	Fragmentgrößen [in Bp]
<i>Hind</i> III	911	7112
<i>Eco</i> RI	953, 2636 2637, 952	1684 5428
<i>Pst</i> I	1137, 2645 2646, 4001 4004, 1136	1509 1356 4247
<i>Sma</i> I	2149, 3761 3762, 2148	1613 5499

Der ungespaltene Vektor (Spur 2, Abbildung 4.7-2) zeigte eine geringe Mobilität im Agarosegel. Möglicherweise handelt es sich dabei um ein dimeres Ligationsprodukt. Die in der Abbildung dargestellten Restriktionsspaltungen belegen die korrekte Insertion eines 1,6 kb HCII-cDNA-Fragmentes in den Vektor pCDNA3.1(+) in der gewünschten Orientierung. Der *Hind*III-gespaltene Vektor (Spur 3) zeigt eine Bande der erwarteten Größe (7112 Bp). Die Insertion einer 1,6 kb-cDNA wird durch die *Eco*RI-Spaltung belegt (Spur 4), durch welche ein Fragment genau dieser Größe gebildet wird. *Pst*I- und *Sma*I-Spaltung (Spuren 5 und 6) belegen die Orientierung der cDNA im Vektor durch Fragmentgrößen in Übereinstimmung mit den in Tabelle 4.7-1 angegebenen Werten.

**Abbildung 4.7-2:** Charakterisierung des Expressionsvektors pHCIIC ΔC durch Restriktionsanalyse (1 % Agarosegel).

Spur 1: 1 kb Größenstandard  
 Spur 2: ungespaltener Vektor  
 Spur 3: Vektor gespalten mit *Hind*III  
 Spur 4: Vektor gespalten mit *Eco*RI  
 Spur 5: Vektor gespalten mit *Pst*I  
 Spur 6: Vektor gespalten mit *Sma*I

Die hier dargestellten Ergebnisse der Plasmidkonstruktion von pHCIIC ΔC sind auf alle anderen generierten Varianten übertragbar. Alle Expressionsvektoren der HCII-Varianten haben einen identischen Aufbau der Vektorelemente, welcher in Abbildung 3.2-1 dargestellt ist.

## 4.8 Produktion von rHCII-Varianten in Zellkulturen

Die Wirkung gezielter Änderungen der HCII-Aminosäuresequenz auf Konformation und Reaktionsverhalten sollten anhand verschiedener Varianten des Serpins untersucht werden. Mittels Transfektion von CHO-DUKX-B1 Zellen durch Vektoren mit genetisch modifizierten HCII-Gensequenzen (siehe 4.7 und Tabelle 3.2-5) wurden Zelllinien generiert, mit deren Hilfe rekombinante Proteine produziert werden konnten. Die Isolierung dieser HCII-Varianten erfolgte durch Reinigung an der hergestellten IgG-Affinitätsmatrix. Die HCII-Proteinvarianten werden im weiteren Verlauf der Arbeit mit Abkürzungen bezeichnet, welche in der folgenden Tabelle aufgeführt sind.

**Tabelle 4.8-1:** Rekombinante HCII-Varianten und ihre Charakteristika

Variante	Aminosäuremerkmal der jeweiligen Position im Protein						
	52	54	68	195	273	323	467
rHCII wt (Wildtyp)	P	G	S	F	C	C	C
rHCII F195C	P	G	S	C	C	C	C
rHCII ΔC	P	G	S	F	S	S	S
rHCII ΔC/F195C	P	G	S	C	S	S	S
rHCII ΔC/P52C/F195C	C	G	S	C	S	S	S
rHCII ΔC/G54C/F195C	P	C	S	C	S	S	S
rHCII ΔC/S68C/F195C	P	G	C	C	S	S	S

### 4.8.1 Etablierung stabil exprimierender CHO-Zelllinien und Produktion von rHCII-Varianten

Durch Transfektion von CHO-DUKX-B1 Zellen wurden Zelllinien erstellt, welche verschiedene rHCII-Varianten exprimierten (siehe 3.3.1). Die Transfektion wurde durch Lipofektion (3.3.4) von *Sca1*-linearisierten Plasmiden vorgenommen, welche jeweils die für die verschiedenen HCII-Varianten kodierenden cDNA-Sequenzen enthielten (3.3.5). 24 Stunden nach der Transfektion wurde die Selektion mit dem Aminoglykosid Geneticin (600 µg/mL) begonnen. In allen Fällen starben 80 bis 90 % der Zellen innerhalb der ersten Woche der Selektionsphase ab. Nicht transfizierte Zellen einer Kontrollpopulation starben innerhalb von fünf Tagen vollständig ab.

Kontrolltransfektionen mit dem Plasmid pCMVβ (Clontech, BD Biosciences), welches eine β-Galaktosidase-Expressionskassette enthält<sup>1</sup>, belegten eine Transfektionseffizienz von nur 20 %, auch wenn laut Herstellerangaben bis zu 80 % der Zellen mit dieser Methode transfiziert werden können. Die geringe Überlebensrate der transfizierten Zellen kann somit

<sup>1</sup> MacGregor & Caskey, 1989

durch eine niedrige Transfektionseffizienz erklärt werden. Der nach der Selektionsphase jeweils erhaltene Zellpool musste über einen Zeitraum von bis zu drei Wochen expandiert werden um genügend Zellen zur Kryokonservierung und HCII-Produktion zur Verfügung zu haben.

Die Produktion fand in 175 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen mit einem Bedeckungsgrad von etwa 80 bis 90 % statt. Dies entsprach etwa 1 bis 2 x 10<sup>7</sup> Zellen mit 0,5 bis 1 x 10<sup>5</sup> Zellen pro cm<sup>2</sup>.

Die rHCII-Varianten sollten unter oxidierenden Bedingungen produziert werden, damit die Varianten mit den neu eingeführten Cysteinen (rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C) im oxidierten Zustand exprimiert werden, d.h. mit gegebenenfalls intakter intramolekularer Disulfidbrücke. Dazu wurde ein Medium eingesetzt, das keine reduktiven Agenzien enthält und Cystin statt Cystein beinhaltet. Dementsprechend wurde auch serumfreies Medium verwendet, mit Insulin und Transferrin als Supplemente. Serumbestandteile hätten Probleme bei der späteren Reinigung und Charakterisierung der exprimierten Proteine bereitet. Die Produktion fand in 80 bis 100 mL Medium bei einer Kultivierungsdauer von fünf Tagen statt. Nach Ende der Kultivierung und Abnahme des Mediums wurde die Konzentration der HCII-Varianten mittels ELISA bestimmt. Die spezifischen Produktivitäten über die Gesamtphase der Kultivierungsverläufe sind in nachfolgender Tabelle (Tabelle 4.8-2) aufgeführt.

**Tabelle 4.8-2:** Spezifische Produktivitäten von rHCII-Varianten in transfizierten CHO-DUKX-B1 Zellen

Variante	spezifische Produktivität [ $\mu\text{g}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{Tag})$ ]
rHCII wt	16
rHCII F195C	3,2
rHCII $\Delta$ C	2,0
rHCII $\Delta$ C/F195C	10
rHCII $\Delta$ C/P52C/F195C	0,5
rHCII $\Delta$ C/G54C/F195C	0,8
rHCII $\Delta$ C/S68C/F195C	0,5

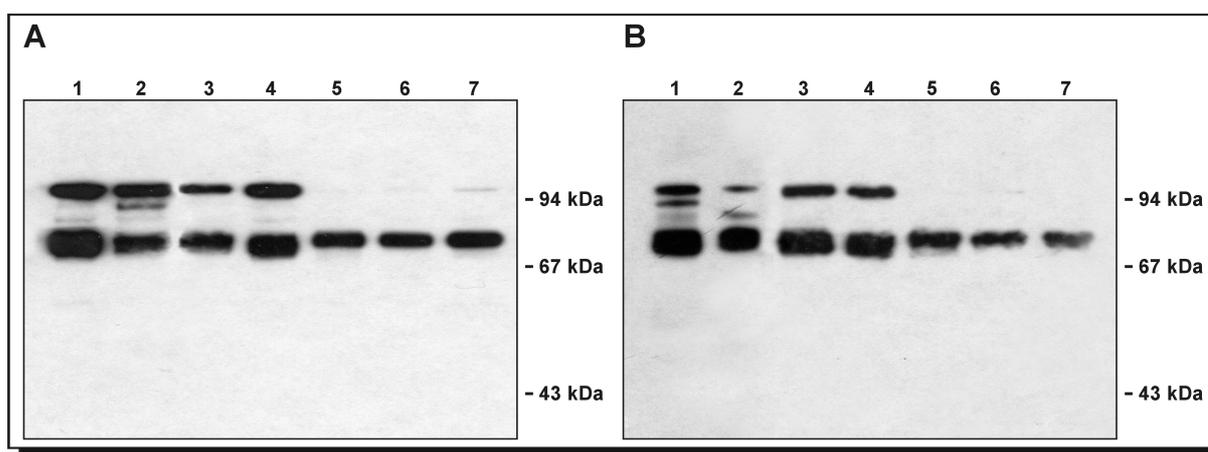
Wie zu erkennen ist, weichen die spezifischen Produktivitäten der transfizierten CHO-DUKX-B1 Zellen weit voneinander ab. Den größten Wert zeigt die Variante rHCII wt. Diese Wildtyp HCII exprimierende CHO-Zelle wurde nicht durch die hier beschriebene Methode selektioniert, sondern lag schon in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Genetik“ vor<sup>1</sup>. Die Zelllinie wurde aus einer einzelnen Zelle mit hoher Expression (nach Genamplifikation) erstellt. Dies erklärt den Unterschied zu den Produktivitäten der Zelllinien, welche aus einem Zellpool hervorgegangen waren. Die abweichenden Produktivitäten der mit Geneticin selektionierten Varianten untereinander können durch unterschiedliche Kopienzahl des transfizierten

<sup>1</sup> Böhme, 2001

Plasmids im Genom der Zelle begründet werden. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die variierenden Produktivitäten ist die Integration der transfizierten DNA in Bereiche mit hoher oder niedriger Genaktivität.

#### 4.8.2 Nachweis von rHCII in Kulturüberständen

Konzentrationsbestimmungen der exprimierten HCII-Varianten in den Kulturüberständen wurden mittels eines ELISA mit zwei monoklonalen Antikörpern vorgenommen. Diese immunologische Detektion belegte die erfolgreiche Expression der HCII-Varianten. Die korrekte Faltung der rekombinanten Proteine und deren biologische Aktivität wurden durch Reaktionen mit humanem  $\alpha$ -Thrombin belegt. Die Komplexbildungsreaktion wurde in Gegenwart der Glykosaminoglykane Heparin und Dermatansulfat vorgenommen (3.10.1). Der Nachweis der biologischen Aktivität erfolgte durch Bildung der SDS-stabilen HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexe, welche in der folgenden Abbildung dargestellt sind.



**Abbildung 4.8-1:** Reaktion der rHCII-Varianten mit  $\alpha$ -Thrombin. Reduzierende SDS-PAGE (10 % Gele, NuPAGE<sup>®</sup>) und Western-Blot der Reaktion zwischen Serpin und Protease in Gegenwart von Heparin (A) oder Dermatansulfat (B). Spuren 1: rHCII wt, Spuren 2: rHCII F195C, Spuren 3: rHCII  $\Delta$ C, Spuren 4: rHCII  $\Delta$ C/F195C, Spuren 5: rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, Spuren 6: rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, Spuren 7: rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C. Die Positionen von Größenmarkern sind rechts angegeben.

Zur Erhaltung möglicher Disulfidbrücken in den rHCII-Varianten, wurden die Komplexbildungsreaktionen unter nicht-reduzierenden Bedingungen vorgenommen. Die rHCII-Varianten mit einem cystinverbrückten N-Terminus (Spuren 5-7) zeigten keine wesentliche Reaktion mit  $\alpha$ -Thrombin. Alle anderen Varianten zeigten die Bildung von Komplexen, was die biologische Funktionalität der Varianten und deren korrekte Sekretion aus den Zellkulturen verdeutlicht. Die HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexe waren als Bande bei ca. 110 kDa zu erkennen, was der Summe der Molekularmassen von HCII und der  $\beta$ -Kette von  $\alpha$ -Thrombin entspricht, wie sie in einer reduzierenden SDS-PAGE ermittelt werden. Die apparente molekulare Masse der  $\beta$ -Kette von  $\alpha$ -Thrombin beträgt in einer SDS-PAGE ca. 33 kDa, für die HCII-Varianten kann eine Masse von 74 kDa ermittelt werden. Die in der

SDS-PAGE ermittelte apparente molekulare Masse von HCII weicht auf Grund posttranslationaler Modifikationen von der tatsächlichen molekularen Masse (65,6 kDa)<sup>1</sup> des Serpins ab. Auch ist die durch SDS-PAGE-Analyse ermittelte molekulare Masse von Proteinen von der Konformation des Polypeptids abhängig (siehe 4.9).

Dass die HCII-Varianten mit cystinverbrücktem N-Terminus (Spuren 5-7) keine wesentliche Komplexbildung zeigten, entsprach den Erwartungen. Der N-Terminus von HCII ist bei der Komplexbildung von  $\alpha$ -Thrombin von zentraler Bedeutung. Er bildet eine Exosite-Verbindung zum  $\alpha$ -Thrombin aus, die notwendig ist, um eine effektive Komplexbildung zu gewährleisten (2.2.3)<sup>2</sup>. Bei den HCII-Varianten mit fixiertem N-Terminus kann eine solche Verbindung nicht stattfinden, was die fehlende Fähigkeit zur Komplexbildung erklärt. Die zum Teil sehr schwach sichtbaren Komplexbanden bei diesen HCII-Varianten werden vermutlich durch geringe Anteile an Proteinen mit geöffneter Disulfidbrücke verursacht.

#### 4.8.3 Isolierung und Reinigung von rHCII-Varianten aus Kulturüberständen

Die Kulturüberstände mit den enthaltenen HCII-Varianten der unterschiedlichen CHO-Zellkulturen (Volumen von 600 bis 1000 mL) wurden wie unter 3.9 beschrieben aufgereinigt. Das große Volumen der Überstände machte eine Aufkonzentrierung notwendig, bevor die rekombinanten Proteine über Immunaффinitäts-Chromatographie isoliert werden konnten. Die Aufkonzentrierung (siehe 3.9.1) erfolgte über einen starken Anionentauscher (Q-Sepharose™ Fast Flow) bei pH 8,0 in einem FPLC®-System. Mit dem großen Probenvolumen war eine lange Applikationszeit verbunden (bis zu vier Stunden). Mit den langen Applikationszeiten kam es zum „Ausbluten“ der Säule, d.h. das Produkt wanderte langsam durch die Säulenmatrix, so dass Anteile an rHCII bereits im Probendurchlauf detektiert werden konnten. Der Verlust von Produkt im Probendurchlauf betrug bis zu 15 %. Mit der Elutionsstufe (bei 500 mM NaCl) wurden im Durchschnitt bis zu 60 % des aufgetragenen rHCII als Produkt im Eluat detektiert. Insgesamt wurden in allen Chromatographieschritten bis zu 80 % des applizierten rHCII wiedergefunden.

Das Eluat der Anionentauscher-Chromatographie war gegenüber dem Ausgangsmaterial um den Faktor 10-20 konzentriert und hatte ein Volumen von ca. 40 mL, das direkt für die Immunaффinitätsreinigung eingesetzt wurde. Die Immunaффinitätsreinigung von rHCII wurde als Stufenprozess im *Batch*-Verfahren durchgeführt (siehe 3.9.2). Bindung und Elution von rHCII an der Anti-HCII-Antikörpermatrix wurden mit den *Gentle Buffer System* von Pierce vorgenommen. Im Eluat (20 mL) befanden sich ca. 80 % des applizierten rHCII. Der Einsatz eines besonderen Elutionspuffers war notwendig, da HCII nicht durch die sonst übliche Senkung des pH-Wertes von der Antikörpermatrix eluiert werden sollte. HCII reagiert sehr empfindlich auf pH-Werte außerhalb des physiologischen Bereichs mit massivem Verlust an

---

<sup>1</sup> Tollefsen *et al.*, 1982

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Sheehan *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1994

biologischer Aktivität. Der verwendete *Gentle Elution Buffer Ag/Ab* hatte einen pH-Wert von 6,8 und basierte auf einer hochkonzentrierten Lösung unbekannter Zusammensetzung mit hoher Osmolarität. Dies stellte sich als kritischer Schritt der gesamten Aufreinigungsmethodik heraus. Es war notwendig die hohe Ionenstärke so rasch wie möglich zu reduzieren, da diese einen negativen Einfluss auf die Proteinfaltung haben kann. Daher wurde eine Dialyse direkt nach der Elution von der Antikörpermatrix durchgeführt. Um die Dialysezeit und die Kontaktdauer von rHCII mit dem Elutionspuffer zu verringern, wurde ein Dialyseschlauch mit einem Molekulargrößendurchschnitt (*Molecular Weight Cut Off*, MWCO) von wenigstens 10 kDa verwendet. Dies verursachte aber einen erheblichen Verlust an Produkt während der Dialyse. Im Durchschnitt betrug die Menge an rHCII im Dialysat etwa 66 % des zur Dialyse eingesetzten Proteins. Eine Konzentrierung des Produktes durch Ultrafiltration mittels Mikrokonzentratoren führte zu einem weiteren Ausbeutenverlust. Das Retentat der Filtration enthielt noch 55 % der ursprünglichen rHCII-Menge. Die Ausbeuten der einzelnen Reinigungs- und Konzentrationsschritte sind in nachfolgender (Tabelle 4.8-3) aufgeführt.

**Tabelle 4.8-3:** Isolierung von rHCII-Varianten aus CHO-Zellkulturüberständen

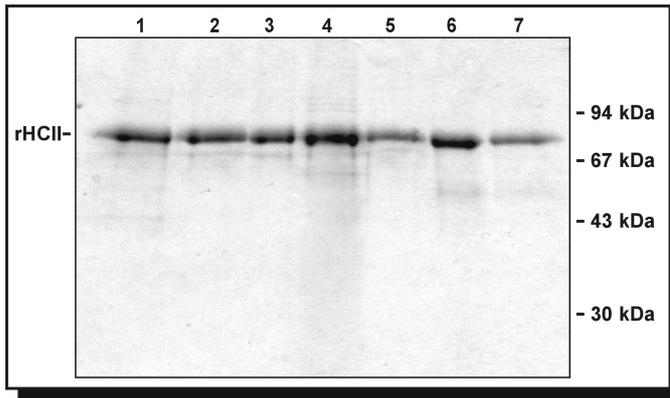
Reinigungsschritt	<sup>a</sup> Ausbeute über alle Schritte in %	<sup>b</sup> Ausbeuten der einzelnen Schritte in %
Kulturüberstand	100	-
Anionentauscher-Chromatographie	60	60
Immunaффinitätsreinigung	46	80
Dialyse	30	66
Ultrafiltration	17	55

Konzentrationen an rHCII-Varianten wurden mit einem ELISA ermittelt. Die angegebenen Prozentwerte sind Mittelwerte aller Aufreinigungen.

<sup>a</sup> Prozentwerte beziehen sich immer auf die rHCII-Konzentration im Kulturüberstand (gleich 100 %).

<sup>b</sup> Prozentwerte sind die Ausbeuten an Produkt eines Reinigungsschrittes mit der Ausbeute des vorherigen Reinigungsschrittes gleich 100 %.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, war die verwendete Methodik der Aufreinigung mit großen Produktverlusten verbunden. Über alle Reinigungsschritte wurden im Mittel nur 17 % des eingesetzten rHCII als verwendbares Produkt gewonnen. Dies entspricht lediglich einer Ausbeute von 80 bis 400 µg aus ca. 600 mL Kulturüberstand. Dennoch war die Menge für die geplanten Studien ausreichend und alle Varianten lagen in einer zufriedenstellenden Reinheit vor.



**Abbildung 4.8-2:** Reduzierende SDS-PAGE und Coomassie-Brilliant-Blau-Färbung der gereinigten rHCII-Varianten.

Spur 1: rHCII wt

Spur 2: rHCII F195C

Spur 3: rHCII ΔC

Spur 4: rHCII ΔC/F195C

Spur 5: rHCII ΔC/P52C/F195C

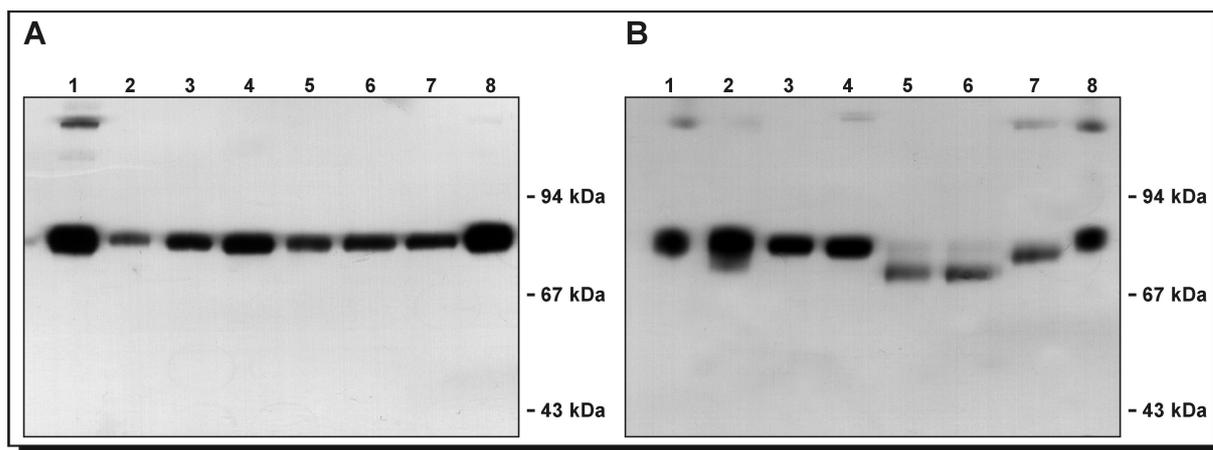
Spur 6: rHCII ΔC/G54C/F195C

Spur 7: rHCII ΔC/S68C/F195C

Wie die obige Abbildung (Abbildung 4.8-2) belegt, waren neben den Proteinbanden der rHCII-Varianten kaum weitere kontaminierende Proteine in den Spuren zu erkennen. Einige schwach erkennbare Banden sind möglicherweise Artefakte der Reinigung oder Abbauprodukte der Varianten. Gemessen an der Gesamtproteinmenge haben diese Kontaminationen keinen nennenswerten Anteil an der Produktmenge.

## 4.9 Nachweis intramolekularer Disulfidbrücken und Reoxidation von rHCII-Varianten *in vitro*

Die Existenz von Disulfidbrücken in Proteinen kann durch Vergleich von SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen kontrolliert werden<sup>1</sup>. Entsprechende Versuche wurden wie unter 3.4.2.1 beschrieben mit allen rekombinanten HCII-Varianten durchgeführt.



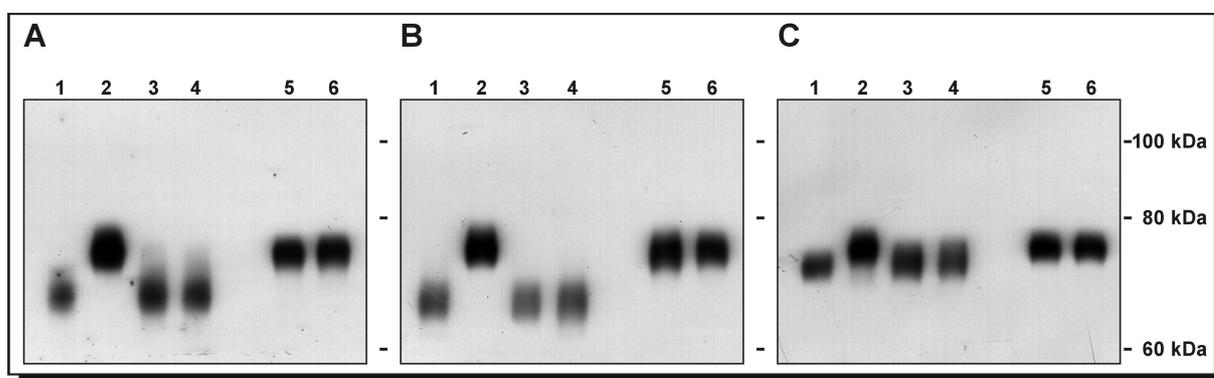
**Abbildung 4.9-1:** Western-Blot-Analyse der rekombinanten HCII-Varianten (10 % Gele, NuPAGE®) unter reduzierenden (A) oder nicht-reduzierenden (B) Bedingungen. Spur 1: rHCII wt, Spur 2: rHCII F195C, Spur 3: rHCII  $\Delta$ C, Spur 4: rHCII  $\Delta$ C/F195C, Spur 5: rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, Spur 6: rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, Spur 7: rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C, Spur 8: Standard-Humanplasma. Die Positionen von Größenmarkern sind rechts angegeben.

Überstände der Zellkulturen wurden durch SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert und als Western-Blot dargestellt (Abbildung 4.9-1). Die durchgeführten Untersuchungen belegten die Existenz von Disulfidbrücken in den rekombinanten HCII-Varianten rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C (Spur 5), rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C (Spur 6) und rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C (Spur 7). Die elektrophoretische Mobilität aller Varianten war unter reduzierenden Bedingungen identisch (Bild A), doch zeigten die Varianten mit einem cystinverbrückten N-Terminus ein abweichendes Laufverhalten unter nicht-reduzierenden Versuchsbedingungen (Bild B). Diese Varianten bewegten sich im elektrophoretischen Feld schneller und zeigten eine geringere apparente molekulare Masse unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Alle Varianten ohne Disulfidbrücke zeigten die gleiche elektrophoretische Mobilität wie unter reduzierenden Bedingungen. Das Ausmaß der Beeinflussung der Mobilität durch Disulfidbrücken ist abhängig von der Position der verbrückenden Cysteine. Eine intramolekulare Verknüpfung führt zu einer Schleifenbildung, die das Polypeptid kompakter werden lässt. Daher wandern die denaturierten Proteine mit einer Disulfidbrücke schneller durch das Gel als die entsprechenden reduzierten

<sup>1</sup> Matsumura & Matthews, 1991

Proteinformen<sup>1</sup>. Unter den drei Varianten mit einer Disulfidbrücke bildet die Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C (Spur 7) die kleinste cystinverbrückte Peptidschleife aus und zeigt daher auch den geringsten Mobilitätsunterschied zur reduzierten Form.

Das obige Ergebnis belegte die Existenz von Disulfidbrücken in allen drei rHCII-Varianten welche durch genetische Manipulation zwei Cysteine besitzen. Die Fixierung des N-Terminus am Proteinkern war somit variabel über drei verschiedene Positionen möglich. Diese drei Varianten zeigten in ihrem oxidierten Zustand keine nennenswerte Reaktivität zu  $\alpha$ -Thrombin (siehe Abbildung 4.8-2). Es bestand die Notwendigkeit zu belegen, dass die Fixierung des N-Terminus nicht zu einer unphysiologische Konformation der rHCII-Varianten geführt hatte. Die intramolekularen Disulfidbrücken hätten auch das Resultat von besonderen Bedingungen in den Zellkulturen sein können. Diese Bedingungen hätten die Bildung von Disulfidbrücken begünstigen oder sogar erzwingen und somit eine abnormale Konformation der rHCII-Varianten verursachen können. Eine solche nicht-physiologische Konformation würde auch zu einer fehlenden Reaktivität der Varianten gegenüber  $\alpha$ -Thrombin führen. Um die Vermutung auszuschließen, dass die Konformation der Cystinverbrückten rHCII-Varianten einen abnormalen Zustand darstellt, wurden Versuche zur Reoxidation der drei Varianten *in vitro* durchgeführt. Die rekombinanten Proteine der Zellkulturüberstände wurden reduziert und nachfolgend mit Kupfer(II)-Phenanthrolin oder Glutathion oxidiert, wie unter 3.4.5 beschrieben. Die Analyse dieser Experimente wurde als Western-Blot einer nicht-reduzierenden SDS-PAGE vorgenommen und ist im Folgenden dargestellt.



**Abbildung 4.9-2:** Reoxidation der rekombinanten HCII-Varianten  $\Delta$ C/P52C/F195C (A),  $\Delta$ C/G54C/F195C (B) und  $\Delta$ C/S68C/F195C (C) *in vitro*. Überstände aus CHO-Zellkulturen der rHCII-Varianten (Spuren 1) wurden mit Dithiothreitol (DTT, 2 mM) reduziert und dialysiert (Spuren 2) und nachfolgend in Gegenwart von Luftsauerstoff durch 50  $\mu$ M Kupfer(II)-Phenanthrolin (Spuren 3) oder in Gegenwart von 2 mM reduziertem und 1 mM oxidiertem Glutathion (Spuren 4) oxidiert. Die Spuren 5 und 6 sind mit 2-Mercaptoethanol versetzte Proben der reoxidierten Produkte (Spuren 3 und 4). Dargestellt sind Western-Blots der entsprechenden nicht-reduzierenden SDS-PAGE (10 % Gel, Tris/Glycin). Die Positionen von Größenmarkern sind rechts angegeben.

Die Reoxidationsexperimente belegten für alle drei Cystinvarianten die Möglichkeit der Bildung einer Disulfidbrücke *in vitro*. Dies konnte aus den Wanderungsgeschwindigkeiten der

<sup>1</sup> Pantoliano *et al.*, 1987; Tan *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1997

reoxidierten Proteine (Spuren 3 und 4) im nicht-reduzierenden SDS-PAGE entnommen werden. Die Wanderungsgeschwindigkeiten entsprachen denen der Varianten vor der Reduktion (Spuren 1). Die Reoxidationen waren unabhängig vom verwendeten Oxidationssystem (Reaktionszeit 16 Stunden) möglich. Sowohl mit Kupfer(II)-Phenanthrolin wie auch mit dem Glutathionsystem konnten die reduzierten Varianten (Spuren 2) nahezu quantitativ in ihre oxidierten Formen mit einer intramolekularen Cystinbindung überführt werden. Die Bildung von dimeren oder multimeren Oxidationsprodukten war nicht zu beobachten. Die Reduktion der reoxidierten Proben mit 2-Mercaptoethanol (Spuren 5 und 6) führte wieder zu dem erwarteten Laufverhalten im SDS-Gel (bei ca. 74 kDa) und belegte, dass die Proteine nicht durch die Reoxidationsversuche degradiert wurden.

Die einfache Reoxidierbarkeit der Varianten spricht dafür, dass die über eine Disulfidbrücke verknüpften Proteinbereiche eine natürliche Nähe zu einander besitzen oder im nativen Molekül benachbart sind. Dementsprechend verursachten die Expressionen der oxidierten rHCII-Varianten in den Zellkulturen auch keine anormale Konformation der Proteinstruktur. In den unterschiedlichen Varianten wurde der N-Terminus von HCII über eine der drei verschiedenen Aminosäurepositionen 52, 54 bzw. 68, mit der an  $\alpha$ -Helix D angrenzenden Position 195 verknüpft. Entsprechend bereits veröffentlichten Ergebnissen<sup>1</sup> existiert eine Wechselwirkung zwischen den entsprechenden Proteindomänen (siehe 2.2.2). Daher kann angenommen werden, dass zwischen den oxidierten und reduzierten Proteinformen der HCII-Varianten höchstens geringfügige Konformationsunterschiede existieren. Andernfalls wäre eine Reoxidation der HCII-Varianten *in vitro* nicht wahrscheinlich gewesen.

---

<sup>1</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Ciaccia *et al.*, 1997; Liaw *et al.*, 1999

## 4.10 Reaktionsverhalten der rHCII-Varianten gegenüber den Proteasen $\alpha$ -Thrombin und $\alpha$ -Chymotrypsin

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit ist die Bedeutung der Konformation von Heparinkofaktor II. Im Besonderen sollte untersucht werden welche Einflüsse die Struktur des Proteins oder von Proteindomänen auf die Wechselwirkung mit Kofaktoren und auf die Reaktivität zu Serinproteasen ausüben. Die Spezifität der Serpin/Protease-Reaktion wird primär durch die Aminosäuren der reaktiven Schleife des Serpins definiert. Doch können bei einigen Serpinen zusätzlich auch Exosite-Wechselwirkungen einen Einfluss auf das Ausmaß der Inhibitionsreaktion haben<sup>1</sup>. Solche Exosite-Wechselwirkungen spielen eine wesentliche Rolle bei der Glykosaminoglykan-beschleunigten Reaktion von HCII mit  $\alpha$ -Thrombin. Dabei verläuft die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII über einen allosterischen Mechanismus unter Beteiligung der N-terminalen Domäne des Serpins (2.2.3)<sup>2</sup>. Der N-Terminus von HCII stellt bei der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin eine Wechselwirkung zu der Anionen-bindenden Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin her. Dieser N-Terminus wurde in einigen rekombinanten HCII-Varianten kovalent über eine Cystinbindung an der Position 195 im Protein fixiert, wodurch der Inhibitionsmechanismus bei diesen Varianten gestört sein sollte.

HCII besitzt seine größte Reaktivität gegenüber den beiden Serinproteasen  $\alpha$ -Thrombin und  $\alpha$ -Chymotrypsin (2.2.1). Das Reaktionsverhalten der generierten Varianten gegenüber den Proteasen  $\alpha$ -Thrombin und  $\alpha$ -Chymotrypsin ist im Nachfolgenden charakterisiert. Der Einfluss des N-Terminus von HCII auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin wurde durch Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeiten der rHCII-Varianten mittels einer Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung (siehe 3.10.6) untersucht.

### 4.10.1 Hemmung von $\alpha$ -Chymotrypsin

Die in Tabelle 4.8-1 beschriebenen HCII-Varianten wurden in CHO-Zellkulturen exprimiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt.

Durch Reoxidationsexperimente (4.9) konnte belegt werden, dass die Konformation nach Bildung der Cystinbindung in den Varianten mit zwei eingefügten Cysteinen (rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C und rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C) nicht erzwungen war. Die Auswirkungen der kovalenten Fixierung des N-Terminus an den Proteinkern von HCII auf die Reaktion zwischen HCII und  $\alpha$ -Thrombin war jedoch nicht klar. Die genaue Lokalisation der cystinverknüpften N-Termini war bislang unbekannt. Es konnte nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass die fixierten N-Termini unter Umständen den Zugang zur reaktiven Schleife („reactive centre loop“, RCL) von HCII blockieren. Dies

<sup>1</sup> Izaguirre *et al.*, 2003

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>; Mitchell & Church, 2002

würde dazu führen, dass die Varianten inaktiv gegenüber einer Reaktion mit den Proteasen  $\alpha$ -Thrombin und  $\alpha$ -Chymotrypsin wären.

Zur Kontrolle der Aktivität der rekombinanten HCII-Varianten wurde eine Messung der Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin durchgeführt. Der Inhibitionsmechanismus dieser Protease bei der Reaktion mit HCII wird durch die Präsenz des N-Terminus nicht beeinflusst<sup>1</sup>. Außerdem sind Glykosaminoglykane für eine effektive Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin nicht notwendig<sup>2</sup>. Die rHCII-Varianten wurden in ihrem oxidierten Zustand untersucht, d.h. in einigen Fällen mit cystinverknüpften N-Termini. Die Durchführung wurde wie unter 3.10.7 beschrieben vorgenommen und die Ergebnisse sind in Tabelle 4.10-1 aufgeführt.

**Tabelle 4.10-1:** Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin durch rekombinante HCII-Varianten

Variante	$k_2$ [ $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]
rHCII wt	$2,5 \pm 0,7 \times 10^5$
rHCII F195C	$1,6 \pm 0,4 \times 10^5$
rHCII $\Delta$ C	$1,5 \pm 0,5 \times 10^5$
rHCII $\Delta$ C/F195C	$1,2 \pm 0,2 \times 10^5$
rHCII $\Delta$ C/P52C/F195C	$1,2 \pm 0,2 \times 10^5$
rHCII $\Delta$ C/G54C/F195C	$1,4 \pm 0,2 \times 10^5$
rHCII $\Delta$ C/S68C/F195C	$1,2 \pm 0,3 \times 10^5$

Die Inhibitionskonstanten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardfehlern aus sechs bis acht Experimenten. Durchführung wie unter 3.7.10 beschrieben mit gereinigten HCII-Varianten unter oxidierenden Bedingungen.

Die ermittelten Inhibitionskonstanten zeigen im Vergleich zum rekombinanten Wildtyp HCII (rHCII wt) für alle Varianten etwas kleinere Werte für die Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin, unabhängig von Art und Position der eingeführten Mutation (rHCII F195C, rHCII  $\Delta$ C oder rHCII  $\Delta$ C/F195C). Auch die Varianten mit intramolekular gebundenem N-Terminus wiesen eine Inhibitionskonstante auf, die nur maximal zweifach kleiner war als die des rekombinanten Wildtyp HCII. Die Verknüpfungsposition des Cysteins im N-Terminus (Position 52, 54 oder 68) an Position 195 hatte keine signifikante Bedeutung für die Reaktionsgeschwindigkeit. Die maximalen Unterschiede in den ermittelten Konstanten ( $2,5 \times 10^5$  bei rHCII wt zu  $1,2 \times 10^5$  bei rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C) sind zu gering um eine wesentliche Änderung der Reaktionsgeschwindigkeiten bei den Varianten zu belegen.

Die hier gemessenen Konstanten bewegen sich im Rahmen der in der Literatur angeführten Größenordnungen für die Inhibitionskonstanten der Reaktion von  $\alpha$ -Chymotrypsin mit HCII ( $2 \times 10^5$  bis  $7,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )<sup>3</sup>. Ebenso stimmen die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse

<sup>1</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Mitchell & Church, 2002

<sup>2</sup> Church *et al.*, 1985; Derechin *et al.*, 1990

<sup>3</sup> Ciaccia *et al.*, 1995; Bauman & Church, 1999

mit zuvor gemachten Beobachtungen überein, welche zeigten, dass der N-Terminus von HCII nur einen sehr geringen Einfluss auf die Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin hat <sup>1</sup>.

Die hier erhaltenen Ergebnisse der Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin belegen, dass die rHCII-Varianten - auch jene mit einem Disulfid-fixierten N-Terminus - reaktiv sind. Ihre reaktiven Schleifen sind demnach für  $\alpha$ -Chymotrypsin normal zugänglich und eine unnatürliche Konformation der Varianten ist somit auszuschließen.

#### 4.10.2 Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen

Aus physiologischer Sicht ist die Reaktion zwischen Heparinkofaktor II und der Serinprotease  $\alpha$ -Thrombin von besonderer Bedeutung. Der Mechanismus ihrer Hemmung durch Komplexierung verläuft mehrstufig unter Konformationsänderungen am Serpin wie auch an der Protease <sup>2</sup>. Die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin wurde in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen mit den gereinigten rekombinanten HCII-Varianten durchgeführt (3.10.6.1). Dabei wurde die Inhibitionskonstante  $k_2$  sowohl für die unbehandelte native Form wie auch für ihre reduzierte und alkylierte Form (siehe 3.4.4) der Varianten ermittelt.

**Tabelle 4.10-2:** Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch rHCII-Varianten in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen

Variante	Unbehandelt	reduziert <sup>a</sup>	Verhältnis [reduziert/unbehandelt]
rHCII wt	$2,9 \pm 0,5 \times 10^4$	$2,9 \pm 0,6 \times 10^4$	1,00
rHCII F195C	$3,2 \pm 0,3 \times 10^4$	$3,2 \pm 0,3 \times 10^4$	1,00
rHCII $\Delta$ C	$1,5 \pm 0,1 \times 10^4$	$1,6 \pm 0,3 \times 10^4$	1,07
rHCII $\Delta$ C/F195C	$1,9 \pm 0,4 \times 10^4$	$2,1 \pm 0,4 \times 10^4$	1,11
rHCII $\Delta$ C/P52C/F195C	$4,0 \pm 1,0 \times 10^3$	$2,1 \pm 0,3 \times 10^4$	5,25
rHCII $\Delta$ C/G54C/F195C	$4,0 \pm 2,7 \times 10^3$	$2,0 \pm 0,2 \times 10^4$	5,00
rHCII $\Delta$ C/S68C/F195C	$3,8 \pm 2,2 \times 10^3$	$1,1 \pm 0,3 \times 10^4$	2,89

Dargestellt sind die Inhibitionskonstanten der HCII-Varianten aus Reaktionen pseudo-erster Ordnung mit der Serinprotease  $\alpha$ -Thrombin (T = 20 °C). Die Daten dokumentieren Mittelwerte und Standardfehler aus acht Versuchen. Die Durchführung wurde wie unter 3.10.6.1 beschrieben vorgenommen.

<sup>a</sup> Die Reduktion der Varianten erfolgte mit DTT und die nachfolgende Alkylierung durch Behandlung mit Iodacetamid.

<sup>1</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Mitchell & Church, 2002

<sup>2</sup> Becker *et al.*, 1999; Fredenburgh *et al.*, 2001

Die Daten der Inhibitionskonstanten der  $\alpha$ -Thrombin-Komplexierung in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen sind in Tabelle 4.10-2 wiedergegeben. Die Werte der Konstanten entsprechen den Literaturdaten ( $2 \times 10^4$  bis  $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )<sup>1,2</sup>. Für die reduzierten und alkylierten Formen der rHCII-Varianten wurden Konstanten erhalten, die sich alle in einem Größenbereich befinden. Die höchsten Werte ( $3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) waren bei den Proteinvarianten rHCII wt und rHCII F195C zu beobachten. Bei allen anderen Varianten, welche auf der Variation  $\Delta C$  basierten, war die ermittelte Inhibitionskonstante geringfügig kleiner mit Werten bei ca.  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Eine kleinere Konstante zeigte lediglich die reduzierte rHCII-Variante  $\Delta C/S68C/F195C$  mit einem Wert von  $1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Insgesamt betrachtet waren die Unterschiede der Inhibitionskonstanten der reduzierten Varianten gering. Für die reduzierten Varianten waren ähnliche Größen der Konstanten auch zu erwarten, da im reduzierten Zustand alle Varianten dem Wildtyp ähneln. Auch war ersichtlich, dass die Reduzierung und Alkylierung mit DTT und Iodacetamid keinen signifikanten Einfluss auf die Inhibitionskonstanten hatte. Deren Werte lagen im gleichen Größenbereich wie die der unbehandelten, nativen Proteinformen der rHCII-Varianten ohne interne Disulfidbrücke (wt, F195C,  $\Delta C$ ,  $\Delta C/F195C$ ).

Unterschiede der Inhibitionskonstanten waren jedoch bei den unbehandelten nativen Varianten zu erkennen. Alle Varianten ohne interne Disulfidbrücke (rHCII wt, rHCII F195C, rHCII  $\Delta C$ , rHCII  $\Delta C/F195C$ ) besaßen eine Konstante im gleichen Größenbereich ( $1,5 \times 10^4$  bis  $3,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Im Gegensatz dazu waren die Inhibitionskonstanten der rHCII-Varianten mit intramolekular fixiertem N-Terminus (rHCII  $\Delta C/P52C/F195C$ , rHCII  $\Delta C/G54C/F195C$ , rHCII  $\Delta C/S68C/F195C$ ) deutlich verringert. Mit Werten von ca.  $4 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  waren diese Konstanten bis zu 8-fach kleiner als die der rHCII-Varianten ohne Disulfidbrücke. Die Fixierung des N-Terminus von HCII scheint somit einen Einfluss auf die Inhibitionsreaktion von  $\alpha$ -Thrombin in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen zu haben.

In der Literatur wird bislang davon ausgegangen, dass der N-Terminus von HCII keine Bedeutung bei der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen spielt<sup>2</sup>. Diese Ergebnisse basieren auf Ergebnissen von HCII-Varianten bei denen der N-terminale Bereiche deletiert ist<sup>2,3</sup>. Solche Varianten können wie auch die hier beschriebenen Disulfid-verbrückten HCII-Varianten nicht an die Anionen-bindende Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin binden. Die hier erzielten Ergebnisse weichen aber von denen der Deletionsmutanten ab. Bei den Varianten mit intramolekularer Disulfidbrücke müssen andere Aspekte für die verringerte Inhibitionskonstante der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin verantwortlich sein. Möglicherweise behindert ein fixierter N-Terminus im HCII eine Konformationsänderung der reaktiven Schleife (RCL) oder die zur Hemmung notwendige

<sup>1</sup> Sheehan *et al.*, 1994; Blinder & Tollefsen, 1990; Han *et al.*, 1997

<sup>2</sup> Baumann & Church, 1999; Mitchell & Church, 2002

<sup>3</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; 1999; Liaw *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>

Insertion der reaktiven Schleife in das  $\beta$ -Faltblatt A von HCII wird erschwert (siehe Abbildung 2.1-2).

#### 4.10.3 Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Anwesenheit von Glykosaminoglykanen

Die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII unterliegt dem Einfluss der Glykosaminoglykane Heparin und Dermatansulfat. Durch diese Kofaktoren lässt sich die Reaktionsgeschwindigkeit um bis zu 1000-fach steigern<sup>1</sup>. Die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII verläuft dabei primär über einen allosterischen Mechanismus, bei dem der N-Terminus des Serpins eine zentrale Rolle spielt<sup>2</sup>. Es wurde postuliert, dass dieser N-Terminus im nativen Zustand durch ionische Wechselwirkung intramolekular am Protein lokalisiert ist und durch die anionischen Glykosaminoglykane von seiner Position verdrängt wird<sup>3</sup>. Der freigesetzte N-Terminus kann dann mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin interagieren, was die Hemmreaktion fördert (siehe Abbildung 2.2-3).

Die Bedeutung des N-Terminus bei diesem Prozess sollte anhand der in dieser Arbeit beschriebenen rHCII-Varianten belegt werden. Die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch die rHCII-Varianten wurde mittels Bestimmung ihrer kinetischen Konstanten (Reaktionskonstante 2. Ordnung,  $k_2$ ) charakterisiert. Die Untersuchungen erfolgten in Gegenwart der Glykosaminoglykane Heparin und Dermatansulfat (siehe 3.10.6.1).

**Tabelle 4.10-3:** Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch rHCII-Varianten in Gegenwart von Heparin

Variante	$k_2$ [ $M^{-1} \text{min}^{-1}$ ]		Verhältnis [reduziert/unbehandelt]
	unbehandelt	reduziert <sup>a</sup>	
rHCII wt	$9,2 \pm 0,5 \times 10^7$	$9,1 \pm 0,9 \times 10^7$	0,99
rHCII F195C	$8,1 \pm 1,3 \times 10^7$	$9,0 \pm 0,5 \times 10^7$	1,12
rHCII $\Delta$ C	$7,2 \pm 0,6 \times 10^7$	$7,0 \pm 0,3 \times 10^7$	0,96
rHCII $\Delta$ C/F195C	$7,3 \pm 0,7 \times 10^7$	$7,6 \pm 0,3 \times 10^7$	1,04
rHCII $\Delta$ C/P52C/F195C	$2,7 \pm 0,5 \times 10^4$	$7,3 \pm 0,4 \times 10^7$	2735
rHCII $\Delta$ C/G54C/F195C	$2,3 \pm 0,5 \times 10^4$	$8,5 \pm 0,7 \times 10^7$	3659
rHCII $\Delta$ C/S68C/F195C	$1,9 \pm 0,6 \times 10^4$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^7$	636

Dargestellt sind die Inhibitionskonstanten der HCII-Varianten mit  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von 10 Units/mL Heparin (Aktivität USP 181 Units/mg). Die Daten wurden aus acht bis 16 Reaktionen ( $T = 20^\circ\text{C}$ ) ermittelt.  
<sup>a</sup> Die Reduktion der Varianten erfolgte mit DTT und die nachfolgende Alkylierung durch Behandlung mit Iodacetamid.

<sup>1</sup> Tollefsen *et al.*, 1982; Tollefsen *et al.*, 1983

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>; Sheehan *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1994

<sup>3</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>b</sup>; Van Deerlin & Tollefsen, 1991

Mit einer Ausnahme zeigten in Gegenwart von Heparin alle reduzierten und alkylierten HCII-Varianten ein äquivalentes Reaktionsverhalten gegenüber  $\alpha$ -Thrombin. Die Inhibitionskonstante des rekombinanten Wildtyps entsprach mit  $9,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  den Werten, welche in der Literatur für diese Variante angegeben sind ( $4 \times 10^7$  bis  $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )<sup>1</sup>. Im Vergleich zum Wildtyp (rHCII wt) waren die Inhibitionskonstanten der Varianten nur geringfügig kleiner und lagen im Bereich von  $7,0$  bis  $9,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Eine Ausnahme stellte hier, wie auch unter allen anderen Bedingungen, die rHCII-Variante  $\Delta\text{C}/\text{S68C}/\text{F195C}$  dar. Deren Konstante war mit  $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  etwa achtfach kleiner als die des Wildtyps. Von dieser Abweichung abgesehen, befanden sich alle ermittelten Inhibitionskonstanten in einem gemeinsamen Größenbereich. Dies entsprach damit auch den Erwartungen, da im reduzierten Zustand die Varianten bezüglich Konformation und Reaktionsmechanismus mit dem Wildtyp vergleichbar sein sollten.

Im Gegensatz dazu zeigte die  $\alpha$ -Thrombininhibition der unbehandelten rHCII-Varianten in Gegenwart von Heparin einige Unterschiede. Die Inhibitionskonstanten der Varianten ohne interne Disulfidbrücke (rHCII wt, rHCII F195C, rHCII  $\Delta\text{C}$ , rHCII  $\Delta\text{C}/\text{F195C}$ ) waren vergleichbar, mit Größen zwischen  $7,2$  und  $9,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Diese Werte entsprachen auch denen, die unter identischen Bedingungen mit den reduzierten Formen dieser Varianten gemessen wurden. Demgegenüber wurden für alle Varianten mit cystinverknüpftem N-Terminus (rHCII  $\Delta\text{C}/\text{P52C}/\text{F195C}$ , rHCII  $\Delta\text{C}/\text{G54C}/\text{F195C}$ , rHCII  $\Delta\text{C}/\text{S68C}/\text{F195C}$ ) Konstanten erhalten, die um ein Vielfaches geringer waren. Diese Varianten zeigten bei intakter Disulfidbrücke Inhibitionskonstanten mit Werten zwischen  $1,9$  und  $2,7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ . Im reduzierten Zustand wurden jedoch Werte zwischen  $1,2$  und  $8,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Somit verursachte eine intramolekulare Fixierung des N-Terminus eine Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit um bis zu 3660-fach gegenüber den entsprechenden reduzierten Proteinformen und waren im Mittel um den Faktor 4000 kleiner als die Hemmkonstante des Wildtyps (rHCII wt).

Nachfolgend wurde die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch die rHCII-Varianten in Gegenwart von Dermatansulfat analysiert. Hierbei zeigten sich einige Unterschiede gegenüber der Heparin-katalysierten Reaktion. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.10-4 dargestellt.

---

<sup>1</sup> Han *et al.*, 1997; Liaw *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Holland *et al.*, 2000

**Tabelle 4.10-4:** Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch rHCII-Varianten in Gegenwart von Dermatansulfat

Variante	Unbehandelt		reduziert <sup>a</sup>	Verhältnis [reduziert/unbehandelt]
	$k_2$ [ $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]			
rHCII wt	$9,3 \pm 0,7 \times 10^7$	$9,3 \pm 0,8 \times 10^7$		1,00
rHCII F195C	$3,0 \pm 0,3 \times 10^7$	$3,6 \pm 0,4 \times 10^7$		1,18
rHCII $\Delta$ C	$1,0 \pm 0,1 \times 10^7$	$8,7 \pm 0,9 \times 10^6$		0,85
rHCII $\Delta$ C/F195C	$1,0 \pm 0,1 \times 10^7$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^7$		1,19
rHCII $\Delta$ C/P52C/F195C	$2,6 \pm 0,4 \times 10^4$	$1,0 \pm 0,2 \times 10^7$		391
rHCII $\Delta$ C/G54C/F195C	$2,1 \pm 0,6 \times 10^4$	$7,2 \pm 0,6 \times 10^6$		339
rHCII $\Delta$ C/S68C/F195C	$1,7 \pm 0,8 \times 10^4$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^6$		113

Inhibitionskonstanten der HCII-Varianten mit  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von 100  $\mu\text{g/mL}$  Dermatansulfat. Die Daten wurden aus acht bis 16 Reaktionen ermittelt ( $T = 20^\circ\text{C}$ ). Zur Entfernung von Heparinkontaminationen wurde Dermatansulfat mit Natriumnitrit behandelt.

<sup>a</sup> Die Reduktion der Varianten erfolgte mit DTT und die nachfolgende Alkylierung durch Behandlung mit Iodacetamid.

Der Wildtyp zeigte Inhibitionskonstanten, die denen vergleichbarer Literaturdaten entsprachen ( $6 \times 10^7$  bis  $7 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ )<sup>1</sup>. Für die reduzierten und alkylierten Formen der rekombinanten Varianten wurden im Vergleich zum Wildtyp verringerte Konstanten erhalten. Der Austausch des Phenylalanins gegen Cystein an Position 195 verursachte eine Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit auf ca. ein Drittel des Wertes vom Wildtyp ( $3,6 \times 10^7$  gegenüber  $9,3 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Bei allen Varianten, bei denen die natürlichen Cysteine gegen Serin ersetzt waren ( $\Delta$ C Variationen), waren kleinere Konstanten für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin zu beobachten. Für die reduzierten Formen der Varianten rHCII  $\Delta$ C, rHCII  $\Delta$ C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C wurden  $k_2$ -Werte erhalten, die zwischen  $7,2 \times 10^6$  und  $8,7 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  betragen und damit geringer waren als die Konstante des Wildtyps. Die Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C zeigte eine noch stärkere Reduktion der Inhibitionskonstante (ca. 46-fach). Die verringerte Reaktionsgeschwindigkeit der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Dermatansulfat (100  $\mu\text{g/mL}$ ) war bei den Varianten ohne ein Cysteinpaar (rHCII F195C, rHCII  $\Delta$ C, rHCII  $\Delta$ C/F195C) auch im unbehandelten (oxidierten) Zustand zu detektieren. Dies verdeutlicht, dass die geringeren Inhibitionskonstanten der Varianten einen Effekt der eingeführten Mutationen darstellten. Die Dermatansulfat-beschleunigte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin scheint im Gegensatz zu Heparin bei den rHCII-Varianten erschwert zu sein, vor allem bei solchen, die auf der cysteinfreien Variation  $\Delta$ C basieren.

Die nicht reduzierten Proteinformen der rekombinanten HCII-Varianten mit intramolekular fixiertem N-Terminus (rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C) zeigten in Gegenwart von Dermatansulfat eine sehr viel kleinere Konstante

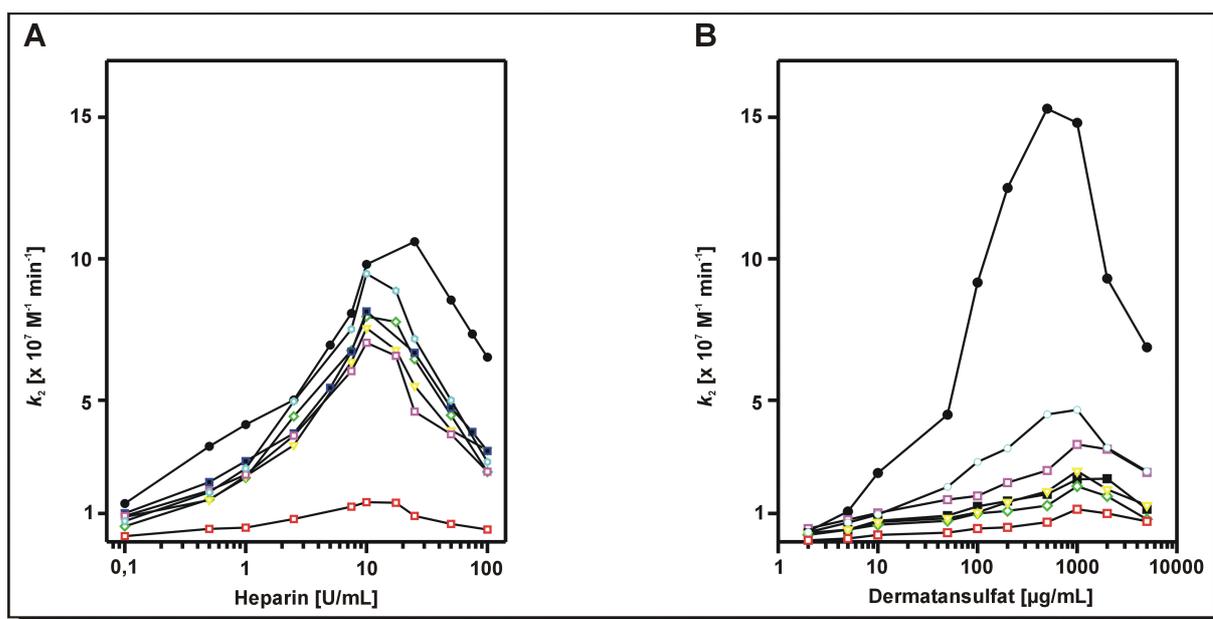
<sup>1</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Bauman & Church, 1999; Colwell et al., 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>

der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin. Deren Werte von ca.  $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  waren 110- bis 390-fach geringer als die Konstanten der entsprechenden Varianten unter reduzierenden Bedingungen. Im Vergleich zum Wildtyp (rHCII wt) waren die Konstanten dieser cystinverbrückten Varianten um den Faktor 4600 kleiner.

Eine wesentliche Erkenntnis der Inhibitionsversuche in Gegenwart von Heparin bzw. Dermatansulfat ist der dramatische Einfluss eines fixierten N-Terminus von HCII auf die Reaktionskonstante der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin. In Gegenwart beider Glykosaminoglykane ist die Reaktion um mehr als 4600-fach langsamer als beim Wildtyp (rHCII wt) mit seinem frei beweglichen N-Terminus. Die Fixierung des N-Terminus behindert die Inhibitionsreaktion offenbar stark. Dieser Befund ist konsistent mit der postulierten Interaktion der N-terminalen Domäne von HCII mit der Anionen-bindenden Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin (siehe 2.2.3). Die freie Beweglichkeit des N-Terminus kann mittels Reduzierung der rHCII-Varianten aber wieder hergestellt werden.

#### **4.10.3.1 Inhibitionskonstanten zweiter Ordnung in Abhängigkeit der Glykosaminoglykankonzentration**

Bei den Inhibitionskonstanten für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Glykosaminoglykanen waren einige auffällige Unterschiede unter den reduzierten rHCII-Varianten zu beobachten. Im Vergleich zum Wildtyp (rHCII wt) waren die Inhibitionskonstanten der Varianten mit Aminosäuresubstitutionen im Falle von Heparin geringfügig kleiner, im Gegenwart von Dermatansulfat jedoch stark verringert. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass die Varianten eine unterschiedliche Affinität zu Dermatansulfat haben und erst bei höheren Konzentrationen des Glykosaminoglykans ihre maximale Inhibitionskonstante besitzen. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden die kinetischen Konstanten ( $k_2$ ) der rHCII-Varianten bei verschiedenen Glykosaminoglykankonzentrationen bestimmt um das Maximum der Inhibitionskonstanten zu ermitteln. Die Versuchsdurchführung gleicht der unter 3.10.6.1 beschriebenen Methodik mit der Änderung, dass variable Konzentrationen an Heparin bzw. Dermatansulfat verwendet wurden.



**Abbildung 4.10-1:** Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch rekombinante HCII-Varianten in Gegenwart verschiedener Konzentrationen an Glykosaminoglykanen. Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin (5 nM) durch rHCII-Varianten (50 nM) und Bestimmung der kinetischen Parameter unter Zusatz von (A) Heparin (181 Units/mg) oder (B) Dermatansulfat im Reaktionsansatz. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte aus wenigstens drei unterschiedlichen Versuchen. Varianten: rHCII wt ( $\bullet$ ), rHCII F195C ( $\circ$ ), rHCII  $\Delta$ C ( $\square$ ), rHCII  $\Delta$ C/F195C ( $\blacksquare$ ), rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C ( $\diamond$ ), rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C ( $\nabla$ ), rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C ( $\square$ ). Die Varianten wurden mit DTT und anschließend mit Iodacetamid behandelt.

Die Abbildung 4.10-1, A zeigt, dass im Falle der durch Heparin vermittelten Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin keine größeren Veränderungen des Maximums auftraten. Die für die maximale Inhibitionskonstante notwendige Heparinkonzentration liegt bei etwa 10 U/mL, unabhängig davon wie groß diese Konstante tatsächlich ist. Dieser Wert stimmt mit bekannten Daten für Wildtyp-HCII überein<sup>1</sup>. Die Affinitäten der rHCII-Varianten zu Heparin scheinen durch die eingeführten Aminosäurevariationen keine Änderung erfahren zu haben.

Die Inhibitionsreaktionen in Gegenwart von Dermatansulfat zeigten geringfügige Unterschiede (Abbildung 4.10-1, B). Die maximale Inhibitionskonstante wurde für den Wildtyp (rHCII wt) mit  $1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  bei ca. 500  $\mu\text{g/mL}$  Dermatansulfat in Übereinstimmung mit der Literatur<sup>2</sup> erreicht. Damit war die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Wildtyp-Variante in Gegenwart von Dermatansulfat größer als in Gegenwart von Heparin wie in der Literatur bereits beschrieben<sup>3</sup>.

Die rekombinanten Varianten hatten ihre maximale Inhibitionskonstante bei einer etwas höheren Dermatansulfatkonzentration. Diese lag etwa zwischen 1000 und 2000  $\mu\text{g/mL}$ . Doch auch bei diesen höheren Konzentrationen wurden keine Inhibitionskonstanten erreicht, die im Größenbereich der Konstante des Wildtyps lagen. Die von den rHCII-Varianten erreichten maximalen Konstanten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin lagen zwischen 1 und

<sup>1</sup> Tollefsen *et al.*, 1983; Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>

<sup>2</sup> Bauman & Church, 1999 ; Colwell *et al.*, 1999

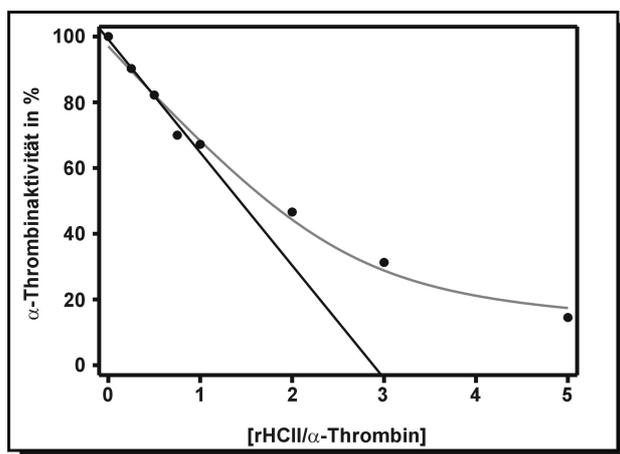
<sup>3</sup> Tollefsen *et al.*, 1983; Pratt *et al.*, 1989

$4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$  und waren damit signifikant kleiner als die Konstante der Wildtypvariante. Veränderte Affinitäten der rHCII-Varianten zu Dermatansulfat konnten somit keine Erklärung für die verringerten Inhibitionskonstanten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin darstellen.

#### 4.10.3.2 Bestimmung der SI-Werte der $\alpha$ -Thrombininhibition

Die Stöchiometrie der Inhibition (SI) stellt eine Möglichkeit dar eine Protease/Serpin-Inhibitionsreaktion näher zu charakterisieren<sup>1</sup>. Der SI-Wert spiegelt dabei das Verhältnis vom inhibitorischen Pfad zum Substratpfad bei der Hemmung von Serinproteasen durch Serpine wieder (2.1.3). Die niedrigen Inhibitionskonstanten, die bei den rekombinanten HCII-Varianten, vor allem in Gegenwart von Dermatansulfat ermittelt wurden (siehe 4.10.3.1), konnten bislang noch nicht eindeutig erklärt werden. Eine Änderung der SI-Werte würde eine mechanistische Basis für die ermittelten Inhibitionskonstanten bieten.

SI-Werte wurden für alle rekombinanten HCII-Varianten in Gegenwart der Glykosaminoglykane Heparin und Dermatansulfat bestimmt. Die rHCII-Varianten wurden in ihrer reduzierten, alkylierten Form untersucht. Die Bestimmung erfolgte dabei wie unter 3.10.9 angegeben. In Abbildung 4.10-2 ist beispielhaft eine SI-Wertermittlung für die Variante rHCII  $\Delta\text{C}/\text{F195C}$  in Gegenwart von Dermatansulfat dargestellt. Der SI-Wert wurde aus dem Schnittpunkt einer Geraden, die mittels linearer Regression erhalten wurde, und aus der Anpassung an einen mathematischen Algorithmus (Gleichung 5, 3.10.8) aus den Versuchsdaten ermittelt.



**Abbildung 4.10-2:** SI-Wertbestimmung der rHCII/ $\alpha$ -Thrombininhibition am Beispiel von rHCII  $\Delta\text{C}/\text{F195C}$  in Gegenwart von Dermatansulfat (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Die rHCII-Varianten wurden mit DTT reduziert und anschließend mit Iodacetamid behandelt. Die Bestimmung der SI-Werte wurde bei allen rHCII-Varianten identisch vorgenommen mit 2 nM  $\alpha$ -Thrombin. Der SI-Wert wurde sowohl über den Schnittpunkt einer Geraden an der Abszisse, wie auch über einen mathematischen Fit (Gleichung 5, 3.10.8) an die Datenpunkte (graue Kurve) bestimmt und aus beiden Methoden ein Mittelwert errechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.10-5 aufgeführt.

<sup>1</sup> Gettins, 2002<sup>a</sup>; Schechter & Plotnick, 2004

In Tabelle 4.10-5 sind die SI-Werte der Reaktionen zwischen  $\alpha$ -Thrombin und den rekombinanten HCII-Varianten in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat aufgeführt. Auffällig ist, dass alle ermittelten SI-Werte deutlich größer als 1 sind. Auch wenn Reaktionen von physiologischer Signifikanz einen SI-Wert von 1 haben sollten, werden für viele Serpin/Protease-Reaktionen größere Werte erhalten<sup>1</sup>. Dies wird häufig bei Reaktionen mit genetisch modifizierten Serpinen beobachtet<sup>2</sup>.

**Tabelle 4.10-5:** SI-Werte der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch rekombinante HCII-Varianten

Variante	Heparin [10 Units/mL]	Dermatansulfat [100 $\mu$ g/mL]
rHCII wt	2,5 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,2
rHCII F195C	2,6 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1
rHCII $\Delta$ C	3,3 $\pm$ 0,2	2,9 $\pm$ 0,2
rHCII $\Delta$ C/F195C	3,3 $\pm$ 0,1	2,7 $\pm$ 0,3
rHCII $\Delta$ C/P52C/F195C	3,9 $\pm$ 0,1	3,1 $\pm$ 0,2
rHCII $\Delta$ C/G54C/F195C	3,9 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,6
rHCII $\Delta$ C/S68C/F195C	5,0 $\pm$ 0,7	5,0 $\pm$ 1,6

Die Stöchiometrie der Inhibition (SI) von  $\alpha$ -Thrombin wurde mit *active site*-titriertem  $\alpha$ -Thrombin (2 nM) und variablen Konzentrationen der verschiedenen rHCII-Varianten in ihren reduzierten Zuständen bestimmt. Die rHCII-Varianten wurden mit DTT reduziert und anschließend mit Iodacetamid behandelt. Die Bestimmung der SI-Werte als Mittelwerte mit Standardfehlern erfolgte aus zwei bis drei Messreihen in Gegenwart der Glykosaminoglykane Heparin (181 USP Units/mg) und Dermatansulfat. Dermatansulfat wurde zur Entfernung von Heparinkontaminationen mit Natriumnitrit behandelt.

Der hier bestimmte SI-Wert für rekombinantes Wildtyp-HCII ist bei Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat mit 2,5 bzw. 2,2 etwas größer als der Wert, der für HCII aus humanem Plasma bestimmt wurde (SI = 1,8; siehe Tabelle 4.5-3). Die mit den rHCII-Varianten ermittelten SI-Werte sind jeweils etwas größer als die Werte des Wildtyps (rHCII wt). Die mit den Varianten gemessenen SI-Werte bieten eine Erklärungsmöglichkeit für die im Vergleich zu rHCII wt geringeren Inhibitionskonstanten unter reduzierenden Bedingungen (Tabelle 4.10-3). Die Stöchiometrie der Inhibition steht mit den Reaktionsgeschwindigkeiten des Substratpfades ( $k_{\text{sub}}$ ) und des Inhibitionspfades ( $k_{\text{inh}}$ ) in folgender Beziehung:  $SI = 1 + k_{\text{sub}}/k_{\text{inh}}$  (zur Beschreibung des Reaktionspfades der Serpine siehe Abbildung 2.1-4). Wenn Reaktionsgeschwindigkeiten - wie in dieser Arbeit - durch Endpunktmessung der Inhibition und unter Bedingungen pseudo-erster Ordnung bestimmt werden, wirkt sich ein großer SI-Wert auf die ermittelte Inhibitionskonstante aus, dabei gilt  $k_2 = k_{\text{inh}} \times 1/SI$ <sup>3</sup>. Bei der Beschreibung der Inhibition anhand der Reduktion der  $\alpha$ -Thrombinaktivität wird bei hohen SI-Werten eine inkorrekte Inhibitionskonstante ( $k_2$ ) ermittelt, da aktive Protease über den

<sup>1</sup> Olson, 1985; Schechter *et al.*, 1989; Patston *et al.*, 1991

<sup>2</sup> Schechter *et al.*, 1993; Djie *et al.*, 1996

<sup>3</sup> Gettins, 2002<sup>a</sup>; Schechter & Plotnick, 2004

Substratpfad rückgebildet wird und wieder an der Inhibitionsreaktion teilnehmen kann. Es wurde daher eine Normierung der Inhibitionskonstanten ( $SI \times k_2$ ) durchgeführt um die korrekte Inhibitionskonstante ( $k_{inh}$ ) zu bestimmen<sup>1</sup>.

**Tabelle 4.10-6:** Normierte Reaktionskonstanten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch rHCII-Varianten in Gegenwart von Glykosaminoglykanen

Variante	Heparin [10 Units/mL]		Dermatansulfat [100 $\mu$ g/mL]	
	$k_{inh}$ [ $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]	Verhältnis [Variante/wt]	$k_{inh}$ [ $M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ]	Verhältnis [Variante/wt]
rHCII wt	$2,2 \times 10^8$	-	$2,0 \times 10^8$	-
rHCII F195C	$2,3 \times 10^8$	1,05	$9,0 \times 10^7$	0,45
rHCII $\Delta$ C	$2,3 \times 10^8$	1,04	$2,5 \times 10^7$	0,12
rHCII $\Delta$ C/F195C	$2,5 \times 10^8$	1,13	$3,3 \times 10^7$	0,16
rHCII $\Delta$ C/P52C/F195C	$2,8 \times 10^8$	1,27	$3,1 \times 10^7$	0,16
rHCII $\Delta$ C/G54C/F195C	$3,3 \times 10^8$	1,49	$2,6 \times 10^7$	0,13
rHCII $\Delta$ C/S68C/F195C	$6,0 \times 10^7$	0,27	$9,9 \times 10^6$	0,05

Kombination der Ergebnisse der Tabellen Tabelle 4.10-3 bzw. Tabelle 4.10-4 und Tabelle 4.10-5. Normierte Konstanten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin der reduzierten und alkylierten rHCII-Varianten.

In Tabelle 4.10-6 sind die normierten Inhibitionskonstanten dargestellt. Die Daten der Inhibitionsreaktion in Gegenwart von Heparin belegen, dass mit einer Ausnahme die Inhibitionskonstanten der Komplexbildung durch die eingeführten Aminosäureänderungen in den rekombinanten Varianten nicht verändert wurden. Die Werte befinden sich alle in demselben Größenbereich ( $2$  bis  $3 \times 10^8 M^{-1} \text{ min}^{-1}$ ). Die Assoziation von Serpin und Protease ist bei den Varianten ebenso wenig verändert, wie die Umwandlung des Acyl-Enzym-Intermediates zum Komplex (Abbildung 2.1-4). Einzige Ausnahme ist hier, wie auch in allen anderen Fällen, die Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C. Deren Besonderheit muss mit der Aminosäureänderung an Position 68 (Ser  $\rightarrow$  Cys) und der Alkylierung zusammenhängen. Dieses erschwert unter Umständen die Assoziation des N-Terminus von HCII an die Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin, wodurch dessen effektive Inhibition beeinflusst wird (5.3.2.3).

Die Korrekturen der Inhibitionskonstanten erklären nicht die verringerten Konstanten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Dermatansulfat. Die errechneten Konstanten sind weiterhin kleiner als die von Wildtyp-HCII (rHCII wt). Dabei muss aber zwischen rHCII-Varianten mit und ohne  $\Delta$ C-Variation unterschieden werden. Die Variante rHCII F195C zeigt eine Reduktion der Inhibition von  $\alpha$ -Thrombin auf etwa die Hälfte des Wertes vom rekombinanten Wildtyp. Eine Verringerung von  $k_{inh}$  wurde für Serpine mit Mutationen im Bereich der reaktiven Schleife und am proximalen Scharnier beschrieben<sup>2</sup>. Die hier

<sup>1</sup> Rubin *et al.*, 1990; Patston *et al.*, 1991; Gettins, 2002<sup>a</sup>; Schechter & Plotnick, 2004

<sup>2</sup> Lawrence *et al.*, 2000

vorgenommene Variation an Position 195 (Phe → Cys) befindet sich zwischen den Domänen  $\alpha$ -Helix D und  $\beta$ -Strang 2A und damit in räumlicher Nähe zum proximalen Scharnier von HCII<sup>1</sup>. Eine lokale Konformationsänderung an Position 195 könnte daher die geringere Inhibitionskonstante der Variante rHCII F195C verursachen.

HCII-Varianten mit der  $\Delta$ C-Variation zeigen eine stärkere Verringerung der Reaktionsgeschwindigkeit in Gegenwart von Dermatansulfat. Im Mittel beträgt die errechnete Konstante  $k_{inh}$  der HCII-Varianten nur 10 bis 15 % des Wertes von rHCII wt (Tabelle 4.10-6). Die Ursache dafür ist nicht klar, doch scheint der Effekt mit dem Austausch der natürlichen Cysteine zusammenzuhängen. Diese Cysteine sind bei allen charakterisierten HCII-Proteinen der Vertebraten konserviert<sup>2</sup>, haben aber keine Bedeutung bei der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Heparin<sup>3</sup> (siehe auch Tabelle 4.10-3). Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse belegen eine unterschiedliche Auswirkung der  $\Delta$ C-Variation auf die Inhibitionsreaktionen in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat. Diese beiden Glykosaminoglykane scheinen die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin von HCII über unterschiedliche Mechanismen zu fördern.

Die Fixierung des N-Terminus von HCII an der Position 195 war variabel über drei Positionen im N-Terminus möglich. Daher scheint die Position des N-Terminus von HCII im nativen Zustand nicht streng geordnet. Die Reoxidationsexperimente (siehe 4.9) belegten diese Flexibilität und waren ein Hinweis für die mögliche intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem aminosäuren N-Terminus und der basischen  $\alpha$ -Helix D von HCII. Die durch kinetische Analysen erhaltenen Ergebnisse belegten den Einfluss der N-terminalen Domäne von HCII auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin. HCII-Varianten mit fixiertem N-Terminus waren nur im geringen Umfang zur Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin befähigt, erreichten aber drastisch höhere Aktivitäten im reduzierten Zustand. Durch die Fixierung der N-terminalen Domäne von HCII war eine Interaktion des Serpins mit der Anionen-bindenden Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin verhindert. Dies belegt die Bedeutung der N-terminalen Domäne von HCII für dessen effektive Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin.

---

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Ragg, 1986; Sheffield *et al.*, 1994; Westrup & Ragg, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Colwell & Tollefsen, 1998

<sup>3</sup> Church *et al.*, 1987

# Kapitel 5

## Diskussion

Heparinkofaktor II (HCII) ist ein Thrombininhibitor, der markante Unterschiede zu anderen Vertretern heparinbindender Serpine aufweist. HCII besitzt eine einzigartige N-terminale Proteindomäne mit einer Länge von ca. 80 Aminosäuren<sup>1</sup>. Diese Proteindomäne enthält zwei Sequenzen aus negativ geladenen Aminosäuren, welche zusammen eine zusätzliche Interaktionsstelle zur Protease  $\alpha$ -Thrombin darstellen<sup>2</sup>. Nach allgemein geltender Vorstellung befindet sich die N-terminale Domäne von HCII im nicht aktivierten Zustand intramolekular am globulären Proteinkern lokalisiert mit Kontakt zur basischen  $\alpha$ -Helix D<sup>3</sup>. Diese Vorstellung wurde in den letzten Jahren vor allem durch die Ergebnisse einer unvollständigen Röntgenkristallographieuntersuchung in Frage gestellt, die jedoch den N-Terminus von HCII bezüglich der Struktur und Position am globulären Proteinkern nicht ermitteln konnte<sup>4</sup>.

Mit der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen HCII und Kofaktoren und deren Einfluss auf den Mechanismus der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin sowie die Bedeutung der N-terminalen Domäne von HCII näher charakterisiert. Im Besonderen wurden strukturelle Aspekte von HCII im Zusammenhang mit der funktionellen Bedeutung der Proteaseinhibierung betrachtet. Ebenso wurde in dieser Arbeit die Position des negativ geladenen N-Terminus von HCII in dessen Proteinstruktur näher bestimmt, um Hinweise zu den offenen Fragen zur Konformation von nativem HCII zu erhalten.

---

<sup>1</sup> Ragg, 1986; Blinder *et al.*, 1988

<sup>2</sup> Hortin *et al.*, 1986; Hortin *et al.*, 1989; Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Sheehan *et al.*, 1994

<sup>3</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Mitchel & Church, 2002

<sup>4</sup> Baglin *et al.*, 2002

## 5.1 Darstellung von HCII

### 5.1.1 Reinigung von humanem HCII aus Plasma

Für Untersuchungen zur Wechselwirkungen mit Kofaktoren wie Kationen und Heparin wurde HCII aus humanem Plasma isoliert. Die Isolierung wurde in Anlehnung an dokumentierte Methoden durchgeführt<sup>1,2</sup>. Änderungen betrafen die Proteinfällungen mit Polyethylenglykol (PEG 8000) und wurden wie bei Böhme<sup>3</sup> beschrieben übernommen. Die Isolierungsmethode umfasste fraktionierte Fällungen mit BaCl<sub>2</sub> sowie PEG 8000 und eine chromatographische Fraktionierung heparinbindender Proteine. Durch eine anschließende Anionentauscherchromatographie wurde HCII erhalten, das eine für viele Anwendungen befriedigende Reinheit aufwies (siehe Abbildung 4.1-2). Die Ausbeute von 35 % entsprach größtmäßig den Literaturdaten (ca. 40 %) <sup>1,3</sup>. Spezielle Untersuchungen wie die Oberflächenplasmonresonanz oder die Fluoreszenzmessungen erforderten jedoch eine höhere Reinheit. Für diese Anwendungsgebiete wurde HCII weiter gereinigt, um kontaminierende Proteine abzureichern. In der Literatur wird dafür häufig eine Gelchromatographie verwendet, die jedoch zu erheblichen Verlusten und zur Verdünnung des Produktes führt. Der während dieser Arbeit beobachtete Effekt einer stärkeren Assoziation von HCII an Heparin in Gegenwart von Zinkionen wurde zur weiteren Reinigung von HCII ausgenutzt. Da nur HCII in Gegenwart von Zinkionen eine Steigerung der Heparinaffinität erfährt, konnte es von den kontaminierenden Proteinen in der Probe separiert werden (siehe Abbildung 4.1-3). Durch diese Heparin-Sepharose-Chromatographie wurde die HCII-Präparation zusätzlich konzentriert. Die Reinheit des Produktes war mit der von gelchromatographischen Verfahren vergleichbar. Die Produktausbeute war mit 70 % aber höher als bei den in der Literatur beschriebenen Gelchromatographien (ca. 40 %) <sup>1,3</sup>.

---

<sup>1</sup> Griffith *et al.*, 1985<sup>b</sup>

<sup>2</sup> Tollefsen *et al.*, 1982; Zhang *et al.*, 1994

<sup>3</sup> Böhme, 2001

### 5.1.2 Produktion und Reinigung von rekombinanten HCII-Varianten

Die verschiedenen rekombinanten HCII-Varianten mussten in einem geeigneten Expressionssystem produziert werden. Dazu wurde ein eukaryotisches System verwendet, um korrekt gefaltetes HCII mit seinen posttranslationalen Modifikationen zu erhalten. CHO-DUKX-B1 Zellen wurden mittels Lipofektion mit den für die rHCII-Varianten kodierenden Plasmiden transfiziert, die auch ein Resistenzgen gegen das Aminoglykosid Geneticin enthielten. Die durch Selektion mit Geneticin (600 µg/mL) erhaltenen stabilen Zelllinien erzeugten deutlich weniger rekombinantes HCII als die verwendete Wildtyp-HCII exprimierende CHO-Zelllinie, die durch Methotrexat-Amplifikation erzeugt worden war. Diese CHO-Zelllinie<sup>1</sup> produzierte bis zu 20-mal so viel rekombinantes HCII als die in dieser Arbeit mit Geneticin selektierten CHO-Zelllinien (Tabelle 4.8-2).

Da die rHCII-Varianten aus Zellkulturen eine unterschiedliche, in einigen Fällen stark verringerte Affinität für Heparin besaßen<sup>2</sup>, konnte ihre Isolierung nicht durch die gleiche Methodik erfolgen, die zur Reinigung von Plasma-HCII verwendet wurde. Das dort eingesetzte Verfahren basierte im Wesentlichen auf der Heparin-Sepharose-Chromatographie. Der durch eine Disulfidbrücke fixierte N-Terminus einiger HCII-Varianten blockierte zumindest teilweise dessen Glykosaminoglykan-Bindestelle. Damit war eine effektive Bindung an Heparin für diese Varianten verhindert und eine einheitliche Reinigung auf der Basis der Heparin-Sepharose-Chromatographie war nicht möglich. Daher wurde zur Reinigung eine Immunaффinitätsmatrix verwendet, die erfolgreich aus Antigen-gereinigten Anti-HCII-Immunglobulinen hergestellt wurde. In Analogie zu beschriebenen Methoden<sup>3</sup> wurden die HCII-spezifischen Immunglobuline an rProtein A gebunden und mittels eines Kopplungsreagenzes kovalent verknüpft. Die Reinigung der rHCII-Varianten an dieser Immunaффinitätsmatrix erfolgte mit hoher Effektivität, doch musste das Eluat der Affinitätsreinigung noch um ca. Faktor 60 konzentriert werden. Die Verwendung einer Ultrafiltration mit Mikrokonzentratoren führte zu einem hohen Verlust (ca. 50 %) an Produkt. Eine Fällung des rekombinanten HCII mit Polyethylenglykol (PEG 8000)<sup>4</sup> könnte möglicherweise einen effektiveren Konzentrierungsschritt darstellen. Die erzielten Produktausbeuten reichten jedoch aus, um die angestrebten Charakterisierungen der HCII-Varianten durchzuführen.

---

<sup>1</sup> Böhme, 2001

<sup>2</sup> Brinkmeyer, 2001

<sup>3</sup> Reeves *et al.*, 1981; Schneider *et al.*, 1982; Accoceberry *et al.*, 2001

<sup>4</sup> Griffith *et al.*, 1985<sup>b</sup>; Zhang *et al.*, 1994

## 5.2 Zinkionen beeinflussen die Konformation von HCII und unterstützen die Interaktion zwischen HCII und Heparin

In dieser Arbeit konnte belegt werden, dass HCII die Fähigkeit besitzt divalente Metallkationen, insbesondere  $\text{Zn}^{2+}$ , zu binden. Die Ionenbindung bewirkt eine Konformationsänderung am HCII und erhöht die Affinität des Serpins zu Heparin.

### 5.2.1 Metallionenbindung von HCII

Die Fähigkeit von HCII divalente Zinkionen zu binden, wurde mit den Methoden der Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) und Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES) gezeigt. Die Metallionen-Affinitätschromatographie war als qualitative Methode geeignet, um die Spezifität der Bindung von HCII an Zinkionen zu belegen (4.3). Eine Kompetition des an die immobilisierten Kationen gebundenen HCII erfolgte durch 25 bis 35 mM Imidazol im Eluens eines Lineargradienten. Auch durch einen Stufengradienten eluierte das gebundenen HCII von den immobilisierten Zinkionen durch eine Konzentrationsstufe von 50 mM Imidazol. Auch wenn die IMAC nicht geeignet ist, um quantitative Aussagen zur Stärke der Protein/Metallionen-Wechselwirkung zu machen, kann doch gefolgert werden, dass die Affinität von HCII zu Zinkionen schwach ist. Proteine die durch Konzentrationen unterhalb von 50 mM Imidazol von dem Metallkation eluiert werden, werden als schwach affin bezeichnet<sup>1</sup>.

Durch Anregungs-Emissionsspektroskopie konnte die HCII/Metallionen-Wechselwirkung näher charakterisiert werden. Die Untersuchungen zeigten eine Intensitätszunahme der intrinsischen Fluoreszenz von HCII in Gegenwart von Zinkionen (4.4). Diese Änderung der Fluoreszenz belegte eine Konformationsänderung des Serpins durch Bindung der divalenten Kationen. Über die Art der Strukturänderung kann keine Aussage gemacht werden, da solche Informationen nicht aus Fluoreszenzmessungen gewonnen werden können<sup>2</sup>. Die Daten konnten jedoch genutzt werden, um die Dissoziationskonstante  $K_d$  der HCII/ $\text{Zn}^{2+}$ -Interaktion mit  $123 \mu\text{M}$  ( $\pm 36 \mu\text{M}$ ) zu bestimmen (4.4.4). Dieser Wert ist mit den Konstanten anderer Zinkionen-bindender Proteine vergleichbar (Tabelle 4.4-2). Die in dieser Arbeit ermittelte Konstante der HCII/ $\text{Zn}^{2+}$ -Interaktionen entspricht in ihrer Größenordnung den Konstanten anderer Protein/ $\text{Zn}^{2+}$ -Wechselwirkungen, für die eine physiologische Relevanz vermutet wird<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> Belew *et al.*, 1987; Hemdan *et al.*, 1989

<sup>2</sup> Dafforn *et al.*, 1999; James *et al.*, 1999; Tew & Bottomley, 2001; Devlin *et al.*, 2002

<sup>3</sup> Bush *et al.*, 1993; Uversky *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Permyakov *et al.*, 2002; Uversky *et al.*, 2002

Die durch AES ermittelte Bindung von Zinkionen an HCII hatte eine strukturelle Änderung am Protein zur Folge, was zu einem Anstieg der intrinsischen Fluoreszenz führte. Dieser Anstieg basierte auf den beiden untersuchten fluorophoren Gruppen Tryptophan und Tyrosin (Abbildung 4.4-2). Da HCII vier Tryptophanreste und 12 Tyrosinreste<sup>1</sup> enthält, ist die Tryptophanfluoreszenz von besonderer Bedeutung, da sie durch eine geringere Anzahl von Gruppen verursacht wird und damit die Fluoreszenz einfacher zuzuordnen ist. Aus den Röntgenstrukturdaten von HCII<sup>2</sup> ist zu entnehmen, dass zwei der vier Tryptophanreste (Positionen 280 und 362) sich im hydrophoben Proteininneren befinden (Abbildung 5.2-3). Die Beeinflussung dieser Positionen durch die geladenen Zinkionen ist daher unwahrscheinlich. Von größerem Interesse sind die Tryptophane an den Positionen 33 und 50 im N-Terminus von HCII. Die Aminosäure an Position 50 befindet sich in räumlicher Nähe zum ersten der beiden negativ geladenen Bereiche im N-Terminus von HCII (siehe 7.3). Es ist bekannt, dass Proteine mit Clustern aus sauren Aminosäuren in der Lage sind, Zinkionen zu binden. So ist für Parathymosin  $\alpha$  und Prothymosin  $\alpha$  die Bindung von Zinkionen durch eine charakteristische Abfolge von sauren Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) in den Proteinen belegt<sup>3</sup>. Zahlreiche saure Aminosäuren finden sich auch im sauren N-terminalen Bereiche von HCII (neun Aspartat-, fünf Glutamat- und zwei sulfatierte Tyrosinreste)<sup>4</sup>. Es besteht somit die Möglichkeit, dass HCII Zinkionen über eine oder beide sauren Bereiche bindet. Dies hätte Auswirkungen auf die Struktur der N-terminalen Domäne von HCII und den darin befindlichen Tryptophanresten an den Positionen 33 und 50. Dies könnte die hier beobachtete Erhöhung der intrinsischen Fluoreszenz von HCII durch Zinkionen erklären

### 5.2.2 Heparinbindung von HCII

In dieser Arbeit wurden die analytische Heparin-Sephrose-Chromatographie verwendet, um die relativen Affinitäten von HCII,  $\alpha$ -Thrombin und dem gemeinsamen Komplex zu dem Glykosaminoglykan Heparin zu bestimmen. Die relativen Affinitäten wurden als NaCl-Konzentration bestimmt, die zur Elution des immobilisierten Proteins von Heparin notwendig war. Eine benötigte höhere NaCl-Konzentration entspricht dabei einer stärkeren Affinität. Die Daten (4.2.1.1) belegten, dass Zinkionen - und im geringeren Umfang Kupfer- und Nickelionen - eine Wirkung auf die Heparinaffinität von HCII haben. Die Affinität von HCII ist in Abwesenheit von Ionen gering und zeigt sich in einer Elution von HCII von Heparin-Sephrose bei 200 mM NaCl. Im vorliegenden Fall wurde die Wechselwirkung zwischen dem Serpin und dem Glykosaminoglykan durch Zinkionen erhöht, so dass die Elution von der Heparin-Sephrose-Matrix erst bei der doppelten NaCl-Konzentrationen im Eluat, bei

---

<sup>1</sup> Blinder *et al.*, 1988; Church *et al.*, 1987; Westrup & Ragg, 1994

<sup>2</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>3</sup> Brand *et al.*, 1988; Chichkova *et al.*, 2000

<sup>4</sup> Ragg, 1986; Blinder *et al.*, 1988

ca. 400 mM NaCl stattfand. Die höhere Affinität von HCII zu Heparin in Anwesenheit von Zinkionen war selektiv im Vergleich zu Kontrollproteinen und war spezifisch für das Kation  $Zn^{2+}$  (Tabelle 4.2-1). Der geringe Einfluss von Kupfer- und Nickelionen auf die Heparinbindung ist auch bei anderen Proteinen mit spezifischer Zink-Wechselwirkung beobachtet worden<sup>1</sup>.

Die Ursache für die höhere Affinität von HCII zu Heparin in Gegenwart von Zinkionen ist nicht klar. Heparin bindet selbst Zinkionen<sup>2</sup> und könnte beispielsweise infolge einer  $Zn^{2+}$ -vermittelten Konformationsänderung die höhere Affinität zu HCII verursachen. Es muss aber auch berücksichtigt werden, dass HCII ebenfalls Zinkionen bindet und durch diesen Prozess eine Konformationsänderung erfährt, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe 4.4). Möglich ist, dass beide Effekte zutreffen und sowohl HCII, als auch das Glykosaminoglykan durch  $Zn^{2+}$  beeinflusst werden, was zu einer höheren Affinität von HCII zu Heparin führt.

Die geringe Affinität von HCII zu Heparin wird wahrscheinlich durch die Konkurrenz zwischen dem Glykosaminoglykan und der negativ geladenen N-terminalen Domäne von HCII um dessen Glykosaminoglykan-Bindestelle ( $\alpha$ -Helix D) verursacht. Verschiedene Untersuchungen zeigen, dass die intrinsische Affinität von HCII zu Heparin höher ist<sup>3</sup>. Die Deletion von Teilen des N-Terminus von HCII (rHCII del74 oder rHCII del75)<sup>4</sup> oder Mutationen von negativ geladenen N-terminalen Aminosäuren (E69Q/D70N/D71N, D72N, Y73F, D75N), welche im Wildtyp-HCII die postulierte intramolekulare Wechselwirkung bewirken<sup>5</sup>, führen zu einer höheren Affinität von HCII zu Heparin. In der Dissertation von C. Böhme<sup>6</sup> konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Sulfatierung an den Tyrosinenresten 60 und 73 die Affinität von HCII zu Heparin zu steigern vermochte. Es wurde postuliert, dass die veränderten negativen Ladungen zu einer schwächeren intramolekularen Bindung des N-Terminus an die Glykosaminoglykan-Bindestelle von HCII führen. Die Bindestelle wäre somit besser und ungehinderter zugänglich, so dass Heparin fester binden könnte. Eine Konkurrenz zwischen Heparin und dem N-Terminus von HCII fände nur noch in geringerem Ausmaß statt. Es ist möglich, dass ein solcher Vorgang am HCII auch durch die Zinkionen verursacht wird und es zu einer spezifischen Kompensation von negativen Ladungen kommt. Doch auch die Bindung der Zinkionen an andere Proteindomänen ist nicht auszuschließen. Eine positivere Nettoladung des HCII bei gebundenen Kationen könnte zu einer festeren Assoziation des Proteins an das polyanionische Heparin führen.

---

<sup>1</sup> Borza & Morgan, 1998; Björk *et al.*, 1989

<sup>2</sup> Parrish & Fair, 1981; Woodhead *et al.*, 1986

<sup>3</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>b</sup>; Van Deerlin & Tollefsen, 1991

<sup>4</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Bauman & Church, 1999; Liaw *et al.*, 1999

<sup>5</sup> Mitchell & Church, 2002

<sup>6</sup> Böhme, 2001

Die Ergebnisse der Heparin-Sepharose-Chromatographie konnten mittels anderer Methoden konkretisiert werden. Die Experimente zur Bindung von HCII an einem Heparin-konjugierten Biochip mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz (siehe 4.2.2) lieferte qualitativ das gleiche Ergebnis wie die Versuche zur Bestimmung der relativen Bindungsaffinitäten von HCII an Heparin HP Sepharose™. Die mittels Oberflächenplasmonresonanz (SPR) durchgeführten Bindungsstudien belegten einen deutlichen Einfluss von Zinkionen auf die Bindung von HCII an den Heparin-konjugierten Biochip. Das Ausmaß der Wechselwirkung zwischen dem Serpin und dem Glykosaminoglykan wurde durch die Anwesenheit von  $Zn^{2+}$ -Ionen gefördert. Andere divalente Kationen waren zu einer solchen Beeinflussung der Bindung weniger oder gar nicht befähigt (siehe 4.2.2.2). Ähnliche Ergebnisse sind für andere heparinbindende Proteine beschrieben. So wird die Affinität des  $\beta$ A4 Amyloid-Precursor-Proteins (APP) zu Heparin in Gegenwart von mikromolaren Zinkkonzentrationen um das 2- bis 4-fache erhöht, andere Kationen ( $Co^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ) sind weniger effektiv<sup>1</sup>. Weitere Beispiele für eine erhöhte Heparinaffinität von Proteinen in Gegenwart von Zinkionen sind das *High Molecular Weight* Kininogen (HK)<sup>2</sup>, Endostatin<sup>3</sup> und das Histidin-Prolin-reiche Glykoprotein (HPRG)<sup>4</sup>. Letzteres zeigt zusätzlich - wie auch das Selenoprotein P<sup>5</sup> - eine stärkere Affinität zu Heparin bei erniedrigten pH-Werten. Eigene SPR-Untersuchungen zeigten diesen Effekt auch bei HCII (Ergebnisse nicht dargestellt). Beim HPRG wird davon ausgegangen, dass es bei erniedrigten pH-Werten zur Protonierung von einzelnen Aminosäuren kommt, wodurch deren Ladung verändert wird. Die Einflüsse von Zinkionen und des pH-Wertes auf die Heparinbindung sollen eine gemeinsame Ursache haben<sup>4</sup>. Es wird angenommen, dass beim HPRG Histidinreste an beiden Effekten beteiligt sind.

Die Änderung der Bindung von HCII an Heparin in Gegenwart von Zinkionen konnte in dieser Arbeit durch die SPR-Methodik quantifiziert werden. Die ermittelte Dissoziationskonstanten  $K_d$  war mit einem Wert von  $0,73 \mu M$  in Anwesenheit von  $50 \mu M Zn^{2+}$  fast viermal kleiner als ohne das divalente Kation im Analyten ( $K_d = 2,67 \mu M$ ). Dies entspricht einer stärkeren Bindung von HCII an das immobilisierte Heparin in Abhängigkeit von Zinkionen. Ein solcher Zusammenhang konnte unter gleichen Versuchsbedingungen beim Kontrollprotein ATIII nicht beobachtet werden (Tabelle 4.2-3).

---

<sup>1</sup> Multhaup *et al.*, 1994

<sup>2</sup> Lin *et al.*, 2000

<sup>3</sup> Ricard-Blum *et al.*, 2004

<sup>4</sup> Borza & Morgan, 1998

<sup>5</sup> Arteel *et al.*, 2000

Die in dieser Arbeit ermittelten Dissoziationskonstanten weichen von den in der Literatur angegebenen Werten ab. Für die HCII/Heparin-Interaktion sind  $K_d$ -Werte zwischen 13 und 35  $\mu\text{M}$  angegeben. Diese wurden durch unterschiedliche Methoden, wie Anregungs-Emissionsspektroskopie von fluoreszenzmarkiertem HCII<sup>1</sup> oder durch quantitative Affinitätschromatographie bestimmt<sup>2</sup>. Ebenfalls durch eine SPR-Methodik wurde für die HCII/Heparin-Interaktion eine Dissoziationskonstante von 3,03  $\mu\text{M}$  ermittelt<sup>3</sup>.

Ebenso wie die Werte bezüglich der HCII/Heparin-Interaktion weichen auch die in dieser Arbeit bestimmten Dissoziationskonstanten der ATIII/Heparin-Wechselwirkung von literaturbekannten Daten ab. Mit ca. 0,7  $\mu\text{M}$  unterscheidet sich dieser Wert von beschriebenen Dissoziationskonstanten mit Werten zwischen 1,7 und 0,13  $\mu\text{M}$ , die mittels Fluoreszenzmessung<sup>4</sup> oder *Stopped Flow* Kinetik<sup>5</sup> bestimmt wurden. Offensichtlich lassen sich die Bindungsdaten verschiedener Methoden nicht miteinander vergleichen. Doch auch innerhalb einer Messmethodik sind die Daten nicht immer vergleichbar. Bei der Oberflächenplasmonresonanz wirkt sich die Art der Ligandenimmobilisierung erheblich auf die Bindungsdaten aus. So ist bekannt, dass durch unterschiedliche Biotinylierung von Heparin (über den reduzierenden Terminus, die Carboxy- oder Aminogruppen des Aminoglykans) unterschiedliche Bindungsaffinitäten von heparinbindenden Proteinen erhalten werden<sup>6</sup>. Bei der Bewertung von Bindungskonstanten sollte berücksichtigt werden, dass Heparin - wie alle Glykosaminoglykane - keine einheitliche Verbindung darstellt. Mikroheterogenitäten werden durch variierende Carboxylierungen und Sulfatierungen verursacht. Das Ausmaß dieser Mikroheterogenitäten ist bei verschiedenen Heparinpräparationen und -chargen unterschiedlich. Streng betrachtet handelt es sich bei einer Interaktion zwischen einem Protein und Heparin nicht um eine bimolekulare Wechselwirkung, sondern um eine Interaktion zwischen einem Protein und einer größeren Anzahl leicht variierender Verbindungen. Eine Angabe von Assoziations- oder Dissoziationskonstanten ist somit nur unter Nennung dieser Einschränkungen sinnvoll. Innerhalb eines identischen Systems ist ein Vergleich von Konstanten jedoch möglich. In dieser Arbeit führten Zinkionen (50  $\mu\text{M}$ ) zu einer fast viermal stärkeren Wechselwirkung zwischen HCII und Heparin. Dieser Effekt ist unabhängig von den absoluten Werten der Dissoziationskonstanten.

---

<sup>1</sup> Weitz *et al.*, 1999

<sup>2</sup> Verhamme *et al.*, 2004

<sup>3</sup> Zhang *et al.*, 2004

<sup>4</sup> Olson & Shore, 1981

<sup>5</sup> Olson *et al.*, 1981

<sup>6</sup> Mach *et al.*, 1993; Osmond *et al.*, 2002

### 5.2.3 Heparinbindung von HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexen

Die Bindung von HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexen an Heparin wurde durch qualitative Heparin-Sepharose-Chromatographie bestimmt. Dabei zeigte der Komplex eine Zinkionen-Abhängigkeit der Heparinaffinität. Der HCII-Komplex mit  $\alpha$ -Thrombin besaß ebenso wie HCII eine höhere relative Heparinaffinität in Gegenwart von 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> (4.2.1.2).

Bislang ist unklar, wie die Heparinbindung des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes realisiert ist. HCII enthält mit der  $\alpha$ -Helix D eine Glykosaminoglykan-Bindestelle,  $\alpha$ -Thrombin verfügt über zwei anionenbindende Exosites. Die Heparinbindung erfolgt beim  $\alpha$ -Thrombin über die Exosite II<sup>1</sup>, die Exosite I besitzt eine schwächere Heparinaffinität<sup>2</sup> und ist bei der Komplexreaktion mit HCII von Bedeutung<sup>3</sup>. Der HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplex besitzt in Abwesenheit von divalenten Kationen eine Affinität von ca. 390 mM NaCl (4.2.1.2). Dieser Wert liegt damit zwischen den Affinitäten der unkomplexierten Komponenten HCII (220 mM NaCl) und  $\alpha$ -Thrombin (510 mM NaCl). Die Affinität des Komplexes könnte somit durch eine erhöhte Heparinaffinität der  $\alpha$ -Helix D von HCII und/oder durch eine verringerte Heparinaffinität der Exosite II von  $\alpha$ -Thrombin bedingt sein.

Nach dem Vorschlag von Huntington *et al.* wird die Protease während der Hemmung durch eine Translokation an die gegenüberliegende Seite des Serpins bewegt (Abbildung 5.2-1). Wahrscheinlich kommt es dabei zu einer Deformation der Protease. Eine solche Deformation hätte Auswirkungen auf die Exosites von  $\alpha$ -Thrombin und könnte zu einer veränderten Heparinaffinität des Komplexes führen. Eine Deformation der Protease wurde beim Serpin-Enzym-Komplex aus  $\alpha_1$ -Antitrypsin und Trypsin beobachtet<sup>4</sup> und die Möglichkeit der Deformation von  $\alpha$ -Thrombin im finalen Komplex wurde in anderen Arbeiten diskutiert<sup>5</sup>.

Im HCII konkurrieren wahrscheinlich die N-terminale Domäne und das Heparin um die Glykosaminoglykan-Bindestelle. Daraus resultiert die geringe Affinität von HCII zu Heparin. Die eigentliche Affinität der Glykosaminoglykan-Bindestelle zu Heparin ist aber dreimal größer, wie durch Deletion des N-Terminus gezeigt wurde<sup>6</sup>. Möglicherweise wird durch die Komplexbildung die Verdeckung der Glykosaminoglykan-Bindestelle durch den N-Terminus von HCII behindert, wodurch sich im Vergleich zum unkomplexierten HCII eine höhere Heparinaffinität ausbilden kann. Möglich ist auch, dass die Komplexbildung und die Insertion der reaktiven Schleife in das  $\beta$ -Faltblatt A von HCII auch eine Strukturänderung der  $\alpha$ -Helix D induziert, die sich auf deren Heparinbindung auswirkt. Ein ähnlicher Vorgang ist bei der Komplexbildung von ATIII beobachtet worden<sup>7</sup>.

---

<sup>1</sup> Bode *et al.*, 1992

<sup>2</sup> Olson *et al.*, 1991

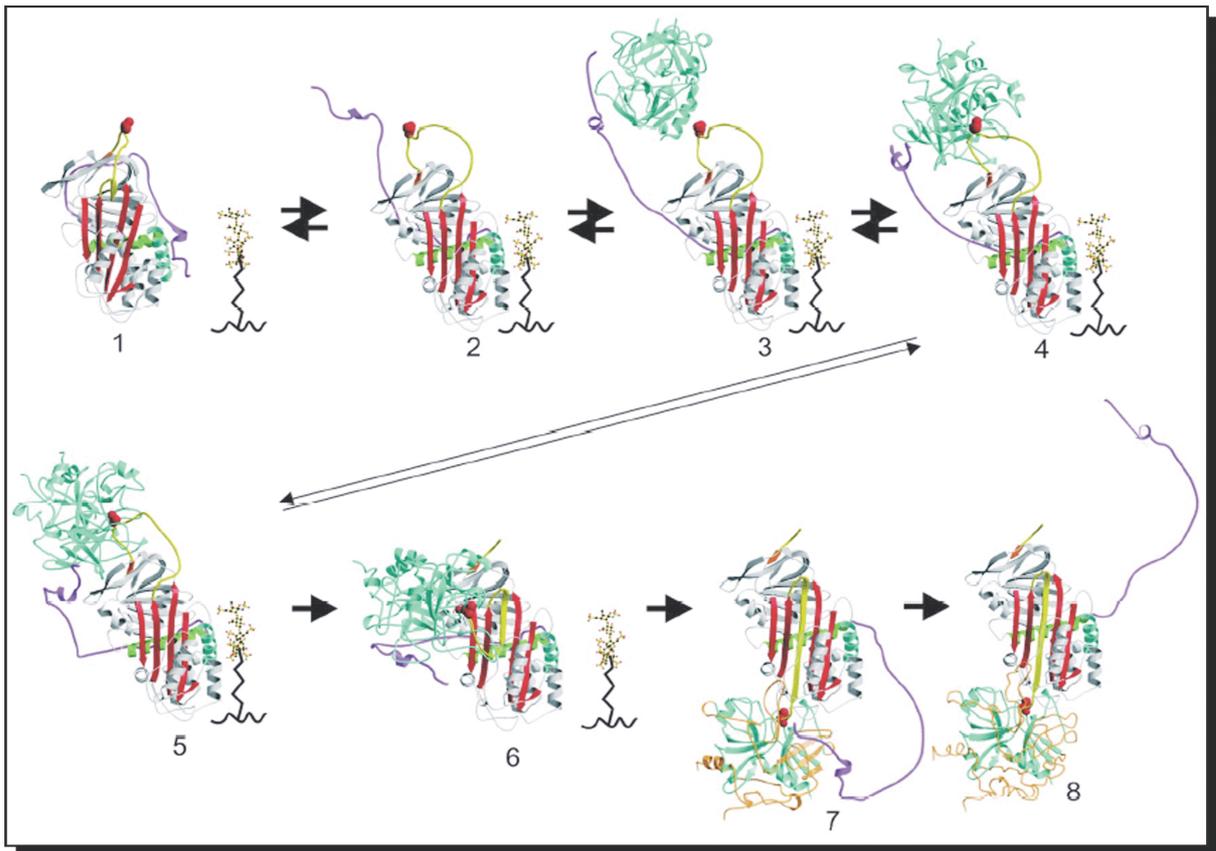
<sup>3</sup> Sheehan *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1994

<sup>4</sup> Huntington *et al.*, 2000<sup>b</sup>

<sup>5</sup> Bock *et al.*, 1997; Fredenburgh *et al.*, 2001

<sup>6</sup> Liaw *et al.*, 1999; Bauman & Church, 1999

<sup>7</sup> van Boeckel *et al.*, 1994



**Abbildung 5.2-1:** Modell für den Verlauf der Glykosaminoglykan-induzierten Inhibition von Thrombin durch HCII (aus Baglin *et al.*, 2002, modifiziert). S195A-Thrombin (cyan); HCII: reaktive Schleife (gelb) mit Leu<sup>444</sup> (Kalottendarstellung, rot),  $\beta$ -Faltblatt A (rot); Heparin (*ball-and-stick*-Darstellung).

Der N-Terminus von HCII ist über die negativ geladenen Domänen an die anionenbindende  $\alpha$ -Helix D (cyan) intramolekular gebunden (Bild 1). Heparin verdrängt den N-Terminus von der  $\alpha$ -Helix D (Bild 2), so dass er an die anionenbindende Exosite I von Thrombin binden kann (Bild 3). Diese Interaktion führt zur Ausbildung eines Begegnungskomplexes, der die beiden Proteine und ihre aktiven Zentren in räumliche Nähe zueinander bringt (Bild 4). Nach Bildung des Michaelis-Komplexes (Bild 5) kommt es zur proteolytischen Spaltung an der P1-P1'-Bindung vom HCII. Zwischen dem Serin<sup>195</sup> der katalytischen Triade von Thrombin und dem Leu<sup>444</sup> von HCII bildet sich eine kovalente Acylbindung aus. In seiner gespaltenen Form geht HCII in eine thermodynamisch stabilere Konformation über. Der aminoternale Bereich der reaktiven Schleife wird als zusätzlicher Faltblattstrang in die Struktur vom  $\beta$ -Faltblatt A integriert. Das kovalent gebundene Thrombin wird dabei einer Translokation unterworfen und auf die gegenüberliegende Seite von HCII bewegt (Bild 6-7). Dieser Prozess verursacht eine Deformation des Thrombins und zerstört die Integrität seiner anionenbindenden Exosite I. Der N-Terminus von HCII löst sich daher vom Thrombin. Eine erneute Bindung des N-Terminus an die anionenbindende  $\alpha$ -Helix D von HCII wird durch die Insertion der reaktiven Schleife in die Struktur vom  $\beta$ -Faltblatt A erschwert (Bild 8).

Die Röntgenstruktur des Michaelis-Komplexes<sup>1</sup> zwischen S195A-Thrombin und HCII (Bild 5, Abbildung 5.2-1) gibt keine genauen Informationen zu den heparinbindenden Domänen oder zur Position des N-Terminus von HCII im stabilen Komplex. Doch wird in der Arbeit die Vermutung geäußert, dass der N-Terminus von HCII im stabilen Komplex nicht mehr an die anionenbindende Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin assoziiert ist. Auch wird davon ausgegangen, dass die Protease eine Konformationsänderung im finalen Komplex erfährt.

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen eine Beeinflussung der Heparinaffinität des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes durch Zinkionen. Dieser Effekt ist bei den unkomplexierten Komponenten nur beim HCII beobachtet worden. Dies lässt die Vermutung zu, dass der Komplex über die Glykosaminoglykan-Bindestelle von HCII an Heparin bindet.

Möglicherweise spielt die Bindung von Glykosaminoglykanen an HCII von HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexen auch bei der Internalisierung dieser Komplexe eine Rolle. Nach dem geltenden Modell wird davon ausgegangen, dass Serpin/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexe an den *low density lipoprotein related protein* Rezeptor (LRP) binden, der für die Internalisierung von Serpin/Thrombin-Komplexen verantwortlich gemacht wird<sup>1</sup>. Die Bindung erfolgt dabei über die Protease, ist aber bei  $\alpha$ -Thrombin-Komplexen schwächer als bei anderen Serinprotease-Komplexen ausgeprägt. Des Weiteren ist bekannt, dass Proteoglykane auf Zelloberflächen als Kofaktoren zur Internalisierung von Serpin/Enzym-Komplexen dienen können, indem sie die Komplexe binden und dem LRP-Rezeptor zuführen<sup>2</sup>. Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit zu entnehmen ist, erfolgt die Bindung der HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexe an Glykosaminoglykane vermutlich über HCII. Die Glykosaminoglykan-Bindestellen von  $\alpha$ -Thrombin scheinen im Komplex mit HCII aber keine Funktionalität mehr zu besitzen, da das Enzym durch die Komplexierung deformiert wird<sup>3</sup>. Es kann angenommen werden, dass auch *in vivo* der  $\alpha$ -Thrombin-Komplex über HCII an Proteoglykane bindet und so die Internalisierung des Komplexes über den LRP-Rezeptor fördert.

#### 5.2.4 Hemmung von $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Zinkionen

In dieser Arbeit konnte die Eigenschaft von HCII gezeigt werden, Zinkionen zu binden und in deren Gegenwart eine festere Bindung mit Heparin einzugehen. Eine verstärkte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII in Gegenwart divalenter Kationen war nicht zu detektieren. Kinetische Messungen zeigten eine geringe Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der  $Zn^{2+}$ -Konzentration, sowohl in Anwesenheit, wie auch Abwesenheit von Heparin (Tabelle 4.5-1). Bei vergleichenden Untersuchungen zur Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch das Serpin ATIII konnte keine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit durch Anwesenheit von Zinkionen festgestellt werden. Dies entsprach bekannten Daten<sup>4</sup> sowie den in den Abschnitten 4.2.2.1, 4.2.2.4, 4.3 und 4.4.3 beschriebenen Untersuchungen, bei denen sich ATIII wie auch  $\alpha$ -Thrombin nicht von Zinkionen beeinflusst wurden.

---

<sup>1</sup> Kounnas *et al.*, 1996; Kasza *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1999

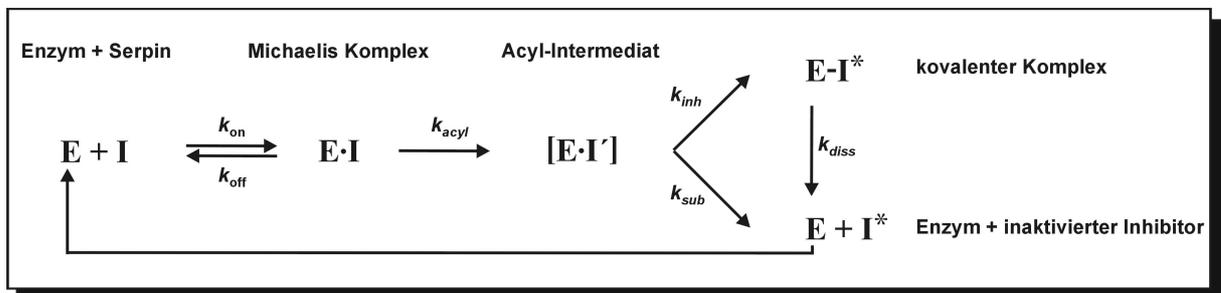
<sup>2</sup> Chappell *et al.*, 1993; Kounnas *et al.*, 1995; Mikhailenko *et al.*, 1995; Sarafanov *et al.*, 2001

<sup>3</sup> Bock *et al.*, 1997; Fredenburgh *et al.*, 2001

<sup>4</sup> Lin *et al.*, 2000

Auch scheint die Fähigkeit von Heparin,  $Zn^{2+}$  zu binden<sup>1</sup> keinen Effekt auf die Inhibierung von  $\alpha$ -Thrombin durch Serpine zu haben. Dies wurde einerseits durch die Inhibierung mit ATIII belegt. Des Weiteren aber auch durch Inhibierungen von  $\alpha$ -Thrombin mittels HCII in Gegenwart von  $Zn^{2+}$  (50  $\mu$ M) und variierenden Konzentrationen an Heparin im Komplexierungsansatz (Abbildung 4.5-1). Die Wirksamkeit des Heparins war durch die zugefügten Zinkionen nicht beeinflusst und die maximale Inhibierung von  $\alpha$ -Thrombin wurde bei der gleichen Heparinkonzentration erreicht.

Die verringerten Reaktionsgeschwindigkeiten der Inhibierung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII in Gegenwart von Zinkionen konnten durch Untersuchungen zur Stöchiometrie der Inhibierung (SI) geklärt werden. Die SI-Werte nahmen sowohl bei der Reaktion mit wie ohne Heparin in Anwesenheit von Zinkionen zu (Tabelle 4.5-3). Dies spricht für eine Änderung des *branched pathway*-Mechanismus (siehe Abbildung 5.2-2) unter dem Einfluss der Zinkionen.



**Abbildung 5.2-2:** *Branched pathway*-Mechanismus der Serpine. Dargestellt sind die wesentlichen Zwischenstufen der Reaktion. E beschreibt das Enzym, I stellt das Serpin dar und  $k$  die jeweilige Geschwindigkeit der Reaktionen. Eine genaue Beschreibung des Mechanismus ist in Abschnitt 2.1.3 wiedergegeben.

Der höhere SI-Wert, der in Anwesenheit der divalenten Kationen ermittelt wurde, deutet darauf hin, dass es vermehrt zur Bildung von inaktiviertem HCII ( $I^*$ ) kam. Es bestehen zwei Möglichkeiten für die Bildung dieser Produkte. Erstens kann das Acyl-Intermediat in größeren Anteilen direkt zur reaktiven Protease geführt haben ( $k_{sub}$ ) oder zweitens könnte der kovalente Komplex ( $E-I^*$ ) schneller und im größeren Umfang zerfallen sein ( $k_{diss}$ ). Beides würde wieder freie Protease (E) generieren, die erneut an weiteren Reaktionen mit HCII teilnehmen kann.

<sup>1</sup> Parrish & Fair, 1981; Woodhead *et al.*, 1986

Kovalente Serpin/Protease-Komplexe sind kinetisch stabile Verbindungen, die nur sehr langsam dissoziieren. Dabei ist die Größe der Dissoziationsrate des Komplexes ( $E-I^*$ ) ein Maß für die Effektivität der Inaktivierung der Protease. Die Dissoziation folgt einer spontanen Hydrolyse der Esterbindung zwischen der P1-Gruppe des Serpins und dem Serin 195 der Protease (nach der auf Chymotrypsin basierenden Nomenklatur<sup>1</sup>). Bei den meisten Serpin/Protease-Reaktionen ist die Geschwindigkeit der Dissoziation  $k_{\text{diss}}$  sehr viel kleiner (Faktor 5 bis 80)<sup>2</sup> als die des Substratpfades  $k_{\text{sub}}$ , so dass der Einfluss der Dissoziation ignoriert werden kann. Diese Dissoziation kann bei modifizierten, gentechnisch erzeugten Serpinen erhöht sein<sup>3</sup>. Auch ist der Effekt beschrieben, dass millimolare Konzentrationen an Kalziumionen, die Dissoziation von verschiedenen Serpin/Protease-Komplexen um bis zu 80-fach erhöhen<sup>4</sup>. Dies soll die Folge von Konformationsänderungen am Komplex sein, die durch die Bindung von Kationen initiiert werden. Für HCII ist beschrieben, dass eine Mutation (L444R) in der reaktiven Schleife des Serpins die Stabilität des HCII/-Thrombin-Komplexes verringert und es vermehrt zur Dissoziation kommt<sup>5</sup>. Auch dort wurde ein höherer SI-Wert der Inhibierung von  $\alpha$ -Thrombin ermittelt. Es besteht grundsätzlich die Möglichkeit, dass Zinkionen die Dissoziation des HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexes fördern. Die divalenten Kationen könnten die Konformation des Komplexes beeinflussen und somit die Dissoziation und die Bildung aktiver Protease fördern, was die Zunahme des SI-Wertes in Gegenwart von Zinkionen erklären würde. Eine solche Dissoziation müsste innerhalb des Messzeitraums stattfinden, um sich auf die ermittelten Reaktionskonstanten auszuwirken. Die Halbwertszeit der Stabilität von Serpin/Enzym-Komplexen beträgt zwischen einigen Stunden bis zu einigen Tagen<sup>6</sup>. In dieser Arbeit wurde die Versuche zur Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII in einem Zeitraum von einigen Minuten durchgeführt. Es ist zweifelhaft, dass eine Dissoziation des kovalenten Komplexes, selbst wenn diese durch Zinkionen beschleunigt wurde, eine Auswirkung auf die Ergebnisse innerhalb des Messzeitraums gehabt hätte. Somit ist eher davon auszugehen, dass die divalenten Zinkionen eine Änderung des Pfades im *branched pathway*-Mechanismus (siehe Abbildung 5.2-2) zugunsten des Substratweges bewirkten und so einen höheren SI-Wert verursachten.

---

<sup>1</sup> Genest & Ptak, 1982

<sup>2</sup> Olson *et al.*, 1995; Zhou *et al.*, 2001; Gettins<sup>a</sup>, 2002; Plotnick *et al.*, 2002<sup>a</sup>

<sup>3</sup> Cooperman *et al.*, 1993; Plotnick *et al.*, 1997; Plotnick *et al.*, 2002<sup>b</sup>

<sup>4</sup> Calugaru *et al.*, 2001

<sup>5</sup> Han *et al.*, 1997; Han & Tollefsen, 1998

<sup>6</sup> Schechter & Plotnick, 2004

### 5.2.5 Zusammenfassende Betrachtung zur möglichen Bedeutung der Zinkionenbindung von HCII

Es ist bekannt, dass die Glykosaminoglykan-Affinität von HCII durch Kofaktoren beeinflusst werden kann. Diese Kofaktoren können auch divalente Kationen sein, wie es beim Calcium-Spirulan<sup>1</sup> oder dem sulfatierten Polysaccharid AFE-HCD der Fall ist<sup>2</sup>. Unter physiologischen Bedingungen spielen eher heparinähnliche Glykosaminoglykane als Bindungspartner von HCII eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit konnte die Eigenschaft von HCII zur Bindung von Zinkionen belegt werden, wie auch ein Einfluss den diese divalenten Kationen auf die Struktur des Serpins ausüben (4.3, 4.4). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Zinkionen die Wechselwirkung zwischen Heparin und HCII verstärken (4.2) wie es auch bei anderen heparinbindenden Proteinen beobachtet wurde<sup>3</sup>.

Die Röntgenstruktur von HCII<sup>4</sup> zeigt kein gebundenes Zinkion, wohl aber ein Kalziumion in Nähe des vierten Stranges vom  $\beta$ -Faltblatt C (Abbildung 5.2-3), welches durch die Histidine an den Positionen 290 und 292 von HCII koordiniert wird. Ein Einfluss von Kalziumionen auf das Bindungs- und Reaktionsverhalten von HCII oder auf dessen intrinsische Fluoreszenz konnte in dieser Arbeit aber nicht ermittelt werden.

HCII besitzt mit der Aminosäureabfolge HExxH einen Teil eines Motivs, das für Zinkbindende Domänen von Metalloproteinasen typisch ist<sup>5</sup>. Die dieses Motiv enthaltende Aminosäuresequenz (<sup>152</sup>GETHEQVHSILHFK<sup>165</sup>) befindet sich vor der heparinbindenden  $\alpha$ -Helix D von HCII und hat Ähnlichkeit mit einer Aminosäuresequenz vom *High Molecular Weight* Kininogen (<sup>462</sup>GHGHEQQHGLGHGH<sup>475</sup>), für die eine Bindung von Zinkionen belegt ist<sup>6</sup>. Auch beim  $\beta$ A4-Amyloid-Precursor-Protein (APP) wird die Bindung von Zinkionen durch Histidinreste bewirkt<sup>7</sup>. Diese Befunde ließen die Vermutung zu, dass in dem beschriebenen HCII-Motiv die Histidinreste die Bindung von Zinkionen bewirken. Die während dieser Arbeit veröffentlichte Röntgenstruktur von HCII<sup>8</sup> zeigte, dass sich die Histidine des postulierten Zink-Bindemotivs im hydrophoben Proteininneren befinden (siehe Abbildung 5.2-3). Eine Wechselwirkung mit den Zn<sup>2+</sup>-Ionen war somit eher unwahrscheinlich. Zudem wurden eigene Experimente mit Varianten von HCII, bei denen die Histidine gegen Glutamine ausgetauscht waren (rHCII H155Q, rHCII H159Q, rHCII H163Q) durchgeführt. Diese Varianten zeigten in Gegenwart von 50  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub> kein vom Wildtyp HCII abweichendes Bindungsverhalten (Ergebnisse nicht dargestellt).

---

<sup>1</sup> Hayakawa *et al.*, 1996; Hayakawa *et al.*, 2003

<sup>2</sup> Hayashi *et al.*, 1997

<sup>3</sup> Bush *et al.*, 1994; Borza & Morgan, 1998; Pan *et al.*, 2002; Ricard-Blum *et al.*, 2004

<sup>4</sup> Baglin *et al.*, 2002

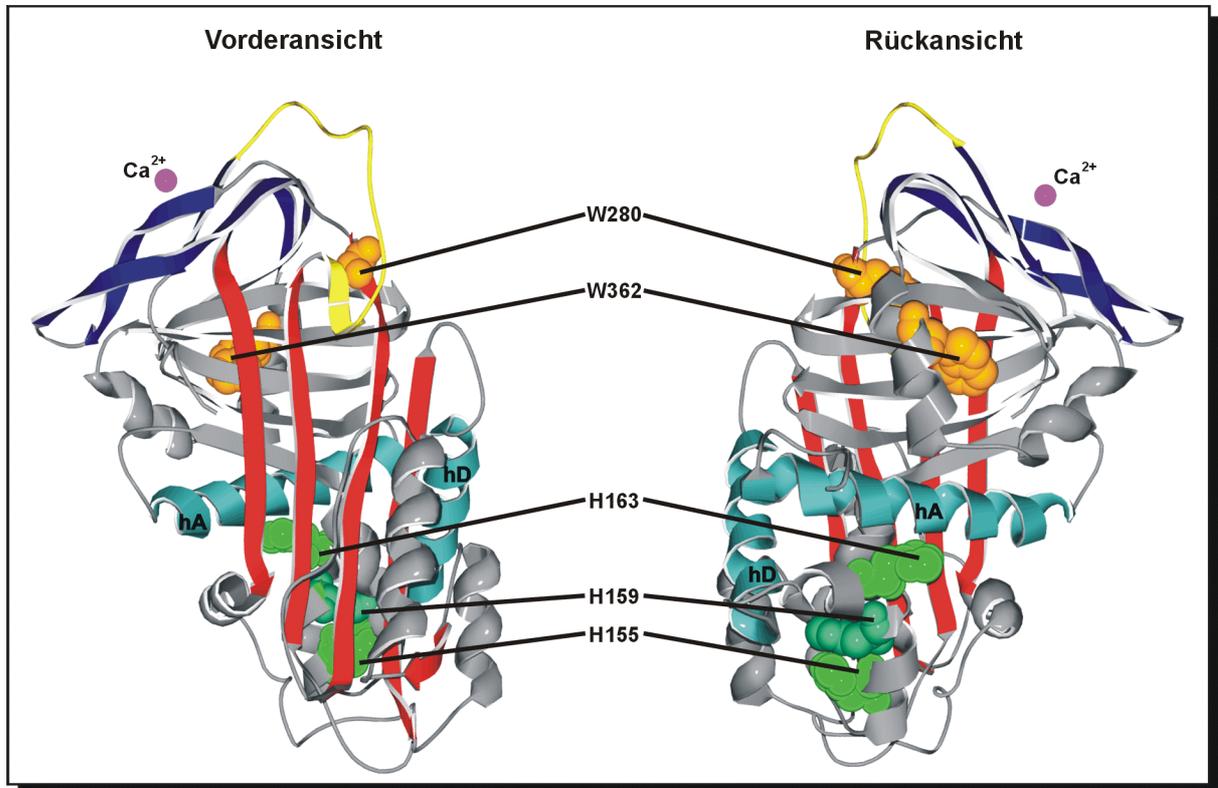
<sup>5</sup> Fushimi *et al.*, 1999; Nagase & Woessner, 1999

<sup>6</sup> Meloni & Schmaier, 1991; DeLa Cadena & Colman, 1992; Lin *et al.*, 2000

<sup>7</sup> Yang *et al.*, 2000

<sup>8</sup> Baglin *et al.*, 2002

Trotz der auffälligen Ähnlichkeit der HCII-Aminosäuresequenz (Positionen 152-165) mit bekannten Zink-bindenden Sequenzen, scheinen diese Histidine (Positionen 155, 159, 163) im HCII nicht an der Bindung von Zinkionen beteiligt zu sein.



**Abbildung 5.2-3:** Bänderdiagramm der Struktur von HCII (AS 95-480) nach der Röntgenstruktur von Baglin *et al.*, 2002 (PDB ID 1JMJ, A). Farblich dargestellt sind: reaktive Schleife (gelb),  $\beta$ -Faltblatt A (rot),  $\beta$ -Faltblatt C (blau),  $\alpha$ -Helix A und  $\alpha$ -Helix D (hA, hD jeweils cyan), Histidinderivate 155, 159, 163 (grün, Kalottendarstellung), Tryptophanreste 280, 362 (orange, Kalottendarstellung), Kalziumion (violett).

Zu den weniger bekannten Zink-bindenden Motiven gehören Cluster von sauren Aminosäuren. In diesen erfolgt die Bindung der Kationen durch Carboxylgruppen benachbarter Aspartat- und Glutamatreste. Die sauren Cluster können das ganze Protein umfassen oder sind in Domänen von 30 bis 50 Aminosäuren konzentriert<sup>1</sup>. Solche Proteindomänen haben eine hohe Ladungsdichte und verfügen dadurch über eine hohe Flexibilität und über keine geordnete Sekundärstruktur. Sie können aber eine definierte Struktur in der Gegenwart von Liganden annehmen, zu denen auch divalente Kationen gehören<sup>2</sup>. Die Bindung von Kationen führt zu einer verringerten elektrostatischen Abstoßung in den negativ geladenen Proteindomänen und fördert Konformationsänderungen des Proteins<sup>3</sup>. Der N-Terminus von HCII enthält einen Bereich (Positionen 49-75, siehe 7.3), mit einem Glutamat/Aspartat-Gehalt von ca. 65%. Die hohe Nettoladung verhindert möglicherweise die Ausbildung einer

<sup>1</sup> Uversky *et al.*, 2000<sup>b</sup>

<sup>2</sup> Goto *et al.*, 1990; Fink *et al.*, 1994

<sup>3</sup> Uversky, 2002

definierten Sekundärstruktur im N-Terminus und könnte auch der Grund dafür sein, dass die N-terminale Domäne von HCII röntgenkristallographisch nicht zu erfassen war<sup>1</sup>. Diese Domäne enthält zwei dem C-Terminus des Peptids Hirudin ähnliche Bereiche (<sup>56</sup>EDDDY\*LD<sup>62</sup> und <sup>69</sup>EDDDY\*ID<sup>75</sup>)<sup>2</sup> mit jeweils einem sulfatierten Tyrosin<sup>3</sup>. Für Hirudin ist eine nicht näher charakterisierte Wechselwirkung mit Zinkionen dokumentiert, die bei der Herstellung von pharmazeutischen Hirudin-Lösungen ausgenutzt werden kann<sup>4</sup>.

Der Glutamat/Aspartat-reiche Bereich im N-Terminus von HCII besitzt auch Ähnlichkeiten mit Sequenzen der humanen Proteine Prothymosin  $\alpha$  und Parathymosin  $\alpha$ . Diese Proteine bestehen zu ca. 50 % aus den Aminosäuren Aspartat und Glutamat und binden spezifisch Zinkionen<sup>5</sup>. Die Bindung von Zinkionen wird dabei über Proteindomänen bewirkt, die eine ähnliche Aminosäuresequenz aufweisen wie der negativ geladene Bereich im N-Terminus von HCII. Dies lässt die Vermutung zu, dass HCII die Zinkionen über die sauren Cluster im N-terminalen Bereich des Proteins bindet.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse könnten mit folgendem Bindungsmodell erklärt werden: Die divalenten Kationen binden spezifisch an den N-Terminus von HCII und kompensieren negative Ladungen in den sauren Clustern. Dadurch wird die intramolekulare Bindung des N-Terminus an die basische Glykosaminoglykan-Bindestelle in der  $\alpha$ -Helix D (siehe 2.2.2) geschwächt, so dass diese leichter für Heparin zugänglich ist. Die verringerte Konkurrenz zwischen N-Terminus und Heparin würde zu einer stärkeren Wechselwirkung zwischen HCII und Heparin führen und die Ergebnisse der Heparin-Bindungsstudien erklären (4.2.1.1 und 4.2.2). Auch die Ergebnisse der Anregungs-Emissionsspektroskopie (AES) sind mit dem Modell vereinbar. HCII enthält zwei Tryptophanreste an den Positionen 33 und 50 (siehe 7.3) der N-terminalen Domäne. Die Bindung von Zinkionen an die sauren Cluster könnte eine Änderung der Sekundärstruktur im Aminoterminus von HCII und/oder eine Konformationsänderung des Proteins bewirken. Dies könnte die sich ändernde intrinsische Tryptophanfluoreszenz (4.4) von HCII in Gegenwart von Zinkionen erklären.

Es besteht die Möglichkeit, dass Zinkionen die Affinität von HCII zu anderen physiologischen Glykosaminoglykanen erhöhen und so die Geschwindigkeit der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII erhöhen. Dermatansulfat- und heparinähnliche Glykosaminoglykane sind die Aktivatoren von HCII *in vivo*. Die Affinität von HCII zu diesen Polyanionen ist bei physiologischen Ionenstärken gering. Trotzdem konnten im humanen Plasma und in humanen Geweben HCII/ $\alpha$ -Thrombin-Komplexe detektiert werden<sup>6</sup>. Zinkionen könnten hier als Modulator der Glykosaminoglykan-Affinität von HCII wirken.

---

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>

<sup>3</sup> Böhme *et al.*, 2002

<sup>4</sup> Gietz *et al.*, 2000

<sup>5</sup> Brand *et al.*, 1988; Uversky *et al.*, 2000<sup>a</sup>

<sup>6</sup> Liu *et al.*, 1995; Kamp *et al.*, 2001

Die  $Zn^{2+}$ -Konzentration in humanem Plasma oder Serum liegt zwischen 10 und 25  $\mu M$ , je nach Alter und Geschlecht des Individuums<sup>1</sup>. Der überwiegende Teil der Zinkionen ist an Proteine gebunden und die Konzentration an freien Zinkionen ist gering (ca. 0,5  $\mu M$ )<sup>2</sup>. Etwa 70 % des  $Zn^{2+}$  in Serum ist lose an eine Proteinfraction gebunden, die bei einer Gelchromatographie in der gleichen Fraction eluiert wie Albumin<sup>3</sup>. Der größte Teil (ca. 99 %) des in einem menschlichen Organismus befindlichen  $Zn^{2+}$  (ca. 2-3 g) liegt intrazellulär<sup>4</sup> oder gebunden im interzellularen Raum vor. So sind verschiedene  $Zn^{2+}$ -bindende Proteoglykane aus Geweben bekannt. Zu diesen gehören auch Decorin und Biglycan, die möglicherweise als  $Zn^{2+}$ -Speicherpools dienen können<sup>5</sup>. HCII bindet an die Glykosaminoglykanstrukturen dieser beiden Proteoglykane und die inhibitorische Funktion von HCII wird durch Decorin und Biglycan aktiviert<sup>6</sup>.

Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Thrombozyten enthalten hohe Konzentrationen (400-1000  $\mu M$ ) an Zinkionen<sup>7</sup>. Es wird vermutet, dass diese Mengen als Antwort auf zelluläre Stimulation in das umgebende Gewebe oder in den Blutstrom freigesetzt werden<sup>8</sup>. So kann die lokale Zink-Konzentration kurzzeitig um ein Vielfaches erhöht werden. Es besteht die Möglichkeit, dass Zinkionen die Interaktionen zwischen HCII und Heparansulfat- sowie Dermatansulfat-Proteoglykanen beeinflussen. Möglicherweise konkurriert HCII mit anderen Proteinen um die selben Bindungspartner in einem Prozess, der von Metallkationen reguliert wird.

---

<sup>1</sup> Whitehouse *et al.*, 1982; Vallee & Falchuk, 1993; Kluszynski *et al.*, 1997

<sup>2</sup> Whitehouse *et al.*, 1983

<sup>3</sup> Parisi & Vallee, 1970

<sup>4</sup> Widdowson *et al.*, 1951

<sup>5</sup> Liu *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2000; Dugan *et al.*, 2003

<sup>6</sup> Whinna *et al.*, 1993; Shirk *et al.*, 2000

<sup>7</sup> Foley *et al.*, 1968; Whitehouse *et al.*, 1982; Marx *et al.*, 1993

<sup>8</sup> Chavakis *et al.*, 1999; Schousboe, 2001

## 5.3 Strukturelle Änderungen von HCII unter Beteiligung der N-terminalen Domäne unterstützen die effektive Inhibition von $\alpha$ -Thrombin

In dieser Arbeit wurde die Lokalisation der N-terminalen Domäne von HCII und die Bedeutung dieser Domäne für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin näher charakterisiert, da aus den Daten der HCII-Röntgenkristallographie von Baglin *et al.* keine Informationen zur Struktur und Position des N-Terminus am globulären Proteinzentrum erhalten wurden<sup>1</sup>.

Der N-Terminus von HCII konnte variabel über drei verschiedene Cysteine (Positionen 52, 54 und 68) intramolekular mit Cystein 195 am HCII-Molekül verknüpft werden. Die inhibitorischen Eigenschaften der HCII-Varianten gegenüber der Serinprotease  $\alpha$ -Thrombin waren im Fall einer kovalenten Verknüpfung des N-Terminus an das globuläre Proteinzentrum von HCII drastisch reduziert.

### 5.3.1 Analyse der reoxidierbaren Disulfidbrücken

Die Verknüpfung von Cysteinresten ist eine Methode um intramolekulare Kontaktstellen in Proteinen zu identifizieren oder um die Bedeutung von Domänen für die Funktion von Proteinen zu bestimmen<sup>2</sup>. In dieser Arbeit wurde die Methode verwendet, um die Lokalisation des N-Terminus von HCII unter physiologischen Bedingungen näher zu definieren. Rekombinante HCII-Varianten wurden in CHO-Zellkulturen exprimiert. Dazu wurde ein Kulturmedium mit nicht-reduzierenden Eigenschaften verwendet, um bei einigen der Varianten eine existierende Disulfidbrücke zu erhalten. Es wurde nachgewiesen, dass die Varianten mit zwei Cysteinen (rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C) als oxidierte Formen mit einer intramolekularen Disulfidbrücke vorlagen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen zeigten diese Varianten eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als unter reduzierenden Bedingungen (Abbildung 4.9-1). Durch Disulfidbrücken verknüpfte Polypeptide sind kompakter und wandern im SDS-Gel schneller<sup>3</sup>. Das Ausmaß der höheren Wanderungsgeschwindigkeit war abhängig von der Position der Cystin-Brücke.

---

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Tiebel *et al.*, 1998; Zeng *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2001; De Taeye *et al.*, 2003

<sup>3</sup> Pantoliano *et al.*, 1987; Matsumura & Matthews, 1991; Tan *et al.*, 1996; Hopkins *et al.*, 1997

Um auszuschließen dass die *in vivo* gebildeten intramolekularen Disulfidbrücken der Varianten während der Biosynthese erzwungen wurden und das Resultat einer Fehlfaltung waren, wurden Reoxidationsexperimente *in vitro* durchgeführt. Für alle drei HCII-Varianten konnte eine Reduktion und Reoxidation belegt werden (Abbildung 4.9-2). Dies zeigt, dass die Verknüpfung des N-Terminus von HCII (Positionen 52, 54 oder 68) mit der Position 195 keine unnatürliche Proteinfaltung induzierte.

Bei dem postulierten HCII-Modell wird davon ausgegangen, dass der N-Terminus von HCII intramolekular mit der anionenbindenden  $\alpha$ -Helix D interagiert und der N-Terminus mit den Glykosaminoglykanen um die Bindung an die  $\alpha$ -Helix D konkurriert<sup>1</sup>. Es wurde gezeigt, dass die Varianten mit intramolekularer Disulfidbrücken eine verringerte relative Heparinaffinität besitzen<sup>2</sup>. Dies weist darauf hin, dass bei diesen Varianten die Glykosaminoglykan-Bindestelle durch den fixierten N-Terminus blockiert und für Heparin nur noch schlecht zugänglich ist. Dieser Befund entspricht dem postulierten HCII-Modell.

Überraschenderweise konnte der N-Terminus von HCII über drei verschiedene Positionen an die exponierte Position 195 zwischen dem Falblattstrang s2A und der  $\alpha$ -Helix D gebunden werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die postulierte intramolekulare Wechselwirkung zwischen dem N-Terminus und der Glykosaminoglykan-Bindestelle  $\alpha$ -Helix D weitaus flexibler ist als bislang angenommen. Der N-Terminus von HCII (Positionen 49-75, siehe 7.3) enthält eine Domäne mit hoher negativer Ladungsdichte. Innerhalb dieser Domäne existieren zwei negativ geladene Bereiche, AR1 (Positionen 49-62) und AR2 (Positionen 63-75). Es wird angenommen, dass diese beiden Bereiche unterschiedliche Funktionen erfüllen (siehe 2.2.3) und dass AR2 an die  $\alpha$ -Helix D bindet und als intramolekulares Analogon eines Glykosaminoglykans fungiert<sup>3</sup>. Eigene Ergebnisse belegten, dass die Fixierung des N-Terminus an der  $\alpha$ -Helix D sowohl über die Positionen 52 und 54 (innerhalb AR1) wie auch über die Position 68 (innerhalb AR2) erfolgen konnte. Proteinbereiche mit hoher Ladungsdichte zeichnen sich durch eine hohe Flexibilität und eine geringe Sekundärstruktur aus<sup>4</sup>. Diese Tatsache könnte eine Erklärung für die Ergebnisse darstellen, dass der N-Terminus über drei verschiedene Positionen (Positionen 52, 54 oder 68) mit der Position 195 verknüpft werden kann. Aufgrund der Flexibilität der beiden negativen Bereiche scheint es keine besonders bevorzugte Positionierung des N-Terminus an der  $\alpha$ -Helix D zu geben. Es ist möglich, dass HCII in Lösung verschiedene alternative Konformationen besitzt, die sich nicht wesentlich voneinander unterscheiden und eine ähnliche thermodynamische Stabilität besitzen.

---

<sup>1</sup> Ragg et al., 1990<sup>a,b</sup>; Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Ciaccia *et al.*, 1997

<sup>2</sup> Brinkmeyer, 2001

<sup>3</sup> Ragg et al., 1990<sup>a,b</sup>; Van Deerlin & Tollefsen, 1991

<sup>4</sup> Wright & Dyson, 1999; Uversky, 2002

### 5.3.2 Analyse des Inhibitionsverhalten der rekombinanten HCII-Varianten

Die kovalente Fixierung der N-terminalen Domäne von HCII an den globulären Proteinkern hat eine Reduzierung der relativen Heparinaffinität zur Folge<sup>1</sup>. Die Bedeutung, die diese intramolekulare Verknüpfung für das Reaktionsverhalten der Varianten hat, wurde anhand der Hemmung der humanen Serinproteasen  $\alpha$ -Chymotrypsin und  $\alpha$ -Thrombin bestimmt.

#### 5.3.2.1 Beleg für die Funktionalität der rekombinanten HCII-Varianten

Durch Reoxidationsexperimente konnte belegt werden, dass die kovalente Fixierung des N-Terminus der Varianten rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C und rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C nicht erzwungen war. Die genaue Positionierung des fixierten N-Terminus war aber nicht bekannt und dieser hätte unter Umständen die freie Zugänglichkeit oder die Funktion der reaktiven Schleife behindern können. Dies hätte eine drastische Beeinflussung der inhibitorischen Funktion der Varianten zur Folge gehabt. Bei der Hemmung von  $\alpha$ -Chymotrypsin zeigten die Varianten mit intramolekular fixiertem N-Terminus ähnliche Inhibitionskonstanten wie Kontrollvarianten ohne Disulfidbrücke (rHCII F195C, rHCII  $\Delta$ C, rHCII  $\Delta$ C/F195C, Tabelle 4.10-1) und die Werte der Konstanten entsprachen denen bereits veröffentlichter Daten<sup>2</sup>. Im Vergleich zum Wildtyp-HCII (rHCII wt) waren die Inhibitionskonstanten aller HCII-Varianten geringfügig kleiner. Bei den Varianten mit intramolekularer Disulfidbrücke hatte die Verknüfungsposition des N-Terminus keinen Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Ergebnisse belegten eine normale Reaktivität der HCII-Varianten gegenüber  $\alpha$ -Chymotrypsin und bestätigten, dass die reaktiven Schleife der Varianten für Proteasen zugänglich waren. Die Fixierung des N-Terminus hatte keine Bedeutung für die Funktionalität der Varianten in Übereinstimmung mit bekannten Ergebnissen die belegten, dass der N-Terminus von HCII bei der Inhibition von  $\alpha$ -Chymotrypsin keinen Effekt hat<sup>3</sup>.

---

<sup>1</sup> Brinkmeyer, 2001

<sup>2</sup> Derechin *et al.*, 1990; Ciaccia *et al.*, 1995; Barman & Church, 1999

<sup>3</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Mitchell & Church, 2002

### 5.3.2.2 Inhibitionsverhalten der HCII-Varianten gegenüber $\alpha$ -Thrombin

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente hatten zum Ziel, den postulierten Mechanismus der Inhibition von  $\alpha$ -Thrombin durch HCII näher zu charakterisieren. Das Modell der Inhibition (siehe Abbildung 2.2-3) beschreibt, dass die N-terminale Domäne von HCII infolge der Bindung von Glykosaminoglykanen an die  $\alpha$ -Helix D eine Positionsveränderung erfährt. Der N-Terminus kann dann an die Anionen-bindende Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin binden und eine Hemmung der Protease fördern<sup>1</sup>. Diese Modellvorstellung wurde hier in Abwesenheit und Anwesenheit von Glykosaminoglykanen unter Verwendung der HCII-Varianten experimentell geprüft.

Die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen ist eher von theoretischem Interesse, da bei einer Hemmung unter physiologischen Bedingungen wohl immer Glykosaminoglykane beteiligt sind. In Abwesenheit von Glykosaminoglykanen wurden unter reduzierenden Bedingungen für alle Varianten ähnliche Konstanten für die Inhibition von  $\alpha$ -Thrombin erhalten, die nur geringfügig kleiner als der Wert des Wildtyps waren (siehe Tabelle 4.10-2). Lediglich die Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C zeigt eine deutlich kleinere Inhibitionskonstante unter diesen Bedingungen (siehe auch 5.3.2.3).

Von besonderer Bedeutung sind die Reaktionsgeschwindigkeiten unter oxidierenden Bedingungen. Die Varianten ohne intramolekulare Disulfidbrücke (rHCII wt, rHCII F195C, rHCII  $\Delta$ C, rHCII  $\Delta$ C/F195C) hatten Konstanten innerhalb eines gemeinsamen Größenbereichs. Die Varianten mit einem fixierten N-Terminus (rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C) zeigten unter identischen Bedingungen aber Inhibitionskonstanten, die bis zu 8-fach kleiner waren. Diese starke Reduktion der Geschwindigkeiten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin bei diesen HCII-Varianten war nicht eindeutig zu erklären. Bisher wurde davon ausgegangen, dass der N-Terminus von HCII lediglich eine Bedeutung bei der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Anwesenheit von Glykosaminoglykanen hat, jedoch nicht in deren Abwesenheit<sup>2</sup>. Diese Schlussfolgerung wurde aus Untersuchungen mit HCII-Deletionsmutanten abgeleitet, deren N-terminale Aminosäuren bis zur Position 74 oder 75 entfernt wurden. Solche HCII-Varianten sind nicht in der Lage, an die Anionen-bindende Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin zu binden (2.2.3), wie es auch bei den rHCII-Varianten mit fixiertem N-Terminus der Fall sein sollte. Die veröffentlichten Inhibitionskonstanten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin sind für solche Deletionsmutanten (rHCII del74 oder rHCII del75) aber nicht identisch. So sind die  $k_2$ -Werte der Deletionsmutanten als größer<sup>3</sup>, gleich groß<sup>4</sup> oder kleiner<sup>5</sup> als jene des Wildtyps angegeben.

---

<sup>1</sup> Rogers *et al.*, 1992; Sheehan *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1994; Myles *et al.*, 1998; Holland *et al.*, 2000

<sup>2</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Mitchell & Church, 2002

<sup>3</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Liaw *et al.*, 1999

<sup>4</sup> Bauman & Church, 1999

<sup>5</sup> Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>

Die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch die HCII-Varianten mit intramolekular fixiertem N-Terminus lässt sich aber auch mit anderen Ergebnissen aus der Literatur vergleichen.  $\alpha$ -Thrombin-Varianten, bei denen Aminosäuren in der Exosite I ausgetauscht wurden, sind nicht mehr zu Wechselwirkungen mit dem N-Terminus von HCII in der Lage. Bei diesen  $\alpha$ -Thrombin-Varianten ist eine Reaktion mit HCII ebenso verringert wie zwischen den Disulfid-verbrückten HCII-Varianten und  $\alpha$ -Thrombin. In einem Fall ist eine Interaktion zwischen Exosite I und dem N-Terminus von HCII aufgrund von Mutationen des  $\alpha$ -Thrombins verhindert, im zweiten Fall verhindert die intramolekulare Fixierung des N-Terminus die Wechselwirkung von HCII mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin. In beiden Fällen ist eine Exosite-Interaktion zwischen HCII und  $\alpha$ -Thrombin nicht möglich. In Abwesenheit von Glykosaminoglykanen wurden für die Hemmung von Exosite I-mutierten  $\alpha$ -Thrombin-Varianten durch Wildtyp-HCII Inhibitionskonstanten erhalten, die um 50 bis 90 % gegenüber der Hemmung der nicht-mutierten Protease verringert waren<sup>1</sup>. Die in dieser Arbeit untersuchten HCII-Varianten mit Disulfid-verbrücktem N-Terminus zeigten für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin Inhibitionskonstanten, die um ca. 80 % geringer waren als die entsprechenden Reaktionen mit ungebundenem N-Terminus (Tabelle 4.10-2). Aus den beiden unterschiedlichen Versuchsanordnungen kann gefolgert werden, dass der N-Terminus von HCII auch in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen eine Bedeutung bei der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin besitzt, und es bei der Inhibitionsreaktion zu einer Interaktion zwischen dem N-Terminus des Inhibitors und der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin kommt. Die Vorstellung, dass Exosite-Kontakte zwischen HCII und  $\alpha$ -Thrombin nur in Gegenwart von Glykosaminoglykanen ausgebildet werden, scheint demnach nicht korrekt zu sein. Wahrscheinlich kommt es beim HCII in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen zu einer spontanen Aufhebung der Wechselwirkung zwischen dem N-Terminus und der basischen  $\alpha$ -Helix D, so dass der N-Terminus die Möglichkeit zur Interaktion mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin hat. Dieser Prozess kann offensichtlich durch Glykosaminoglykane verstärkt werden, ist aber nicht von ihnen abhängig. Wie schon zuvor in dieser Arbeit beschrieben scheint der N-Terminus von HCII sehr flexibel zu sein (siehe 5.2.5), so dass HCII in Lösung in einem Gleichgewicht verschiedener Konformere vorliegt.

---

<sup>1</sup> Sheehan *et al.*, 1993; Sheehan *et al.*, 1994; Myles *et al.*, 1998; Fortenberry *et al.*, 2004

Nach einer geltenden Modellvorstellung erfolgt die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart der Glykosaminoglykane Heparin und Dermatansulfat über einen allosterischen Mechanismus<sup>1</sup>. Im Falle von Heparin besteht zusätzlich die Möglichkeit, dass die Hemmung über einen Doppelbrücken-Mechanismus verläuft<sup>2</sup> (siehe Abbildung 2.2-3). Bei beiden Mechanismen wird die Position des N-Terminus durch Bindung der Glykosaminoglykane an der  $\alpha$ -Helix D verändert, in dessen Folge der N-Terminus an die Anionen-bindende Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin binden kann. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sind mit dem allosterischen Mechanismus im Einklang.

Die kovalente Fixierung des N-Terminus am globulären Proteinkern von HCII hatte eine drastische Verringerung (300- bis 3000-fach) der inhibitorischen Aktivität in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat zur Folge (siehe 4.10.3), war beim Heparin aber (Tabelle 4.10-3, Tabelle 4.10-4) stärker ausgeprägt. Die Inhibitionskonstanten der Disulfid-verknüpften HCII-Varianten waren unter identischen Versuchsbedingungen um bis zu 3600-fach kleiner als bei Varianten ohne Disulfidbrücken (rHCII F195C, rHCII  $\Delta$ C, rHCII  $\Delta$ C/F195C) oder Wildtyp (rHCII-wt). Nach Reduktion der Disulfidbrücken erreichten die Varianten aber wieder ihre volle Aktivität, mit Inhibitionskonstanten im gleichen Größenbereich wie die Konstante des Wildtyps. Dieser Befund bestätigt, dass die freie Beweglichkeit der N-terminalen Domäne von HCII ein wesentlicher Aspekt der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Glykosaminoglykanen darstellt. Im oxidierten Zustand sind die Varianten mit fixiertem N-Terminus mit Varianten vergleichbar, die eine N-terminale Deletion aufweisen (del74 oder del75). Im Vergleich zum Wildtyp zeigen diese ebenso eine stark verringerte Inhibitionskonstante in Gegenwart von Glykosaminoglykanen<sup>3</sup>. Die Bedeutung des N-Terminus von HCII bei der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin ist damit zweifelsfrei nachgewiesen.

In Gegenwart von Glykosaminoglykanen wurden Inhibitionskonstanten der Disulfid-verbrückten HCII-Varianten erhalten, die etwa 5-fach größer waren als die der unbehandelten Varianten in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen (siehe Tabelle 4.10-2 und 4.10-3). Bei vollständiger Eliminierung der allosterischen Aktivierung wären vergleichbare Reaktionsgeschwindigkeiten zu erwarten gewesen. Die höheren Inhibitionskonstanten könnten die Folge von Kontaminationen durch reduzierte Proteinformen sein. Solche HCII-Varianten, die durch Öffnung der Disulfidbrücken entstanden sind, könnten eine Auswirkung auf die gemessenen Geschwindigkeiten der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin gehabt haben.

---

<sup>1</sup> Sheehan *et al.*, 1994; Holland *et al.*, 2000

<sup>2</sup> Myles *et al.*, 1998; Liaw *et al.*, 1999; Fortenberry *et al.*, 2004

<sup>3</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Bauman & Church, 1999; Liaw *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>

Aber auch andere Begründungen für die erhöhten Inhibitionskonstanten sind möglich. Die HCII-Varianten mit fixiertem N-Terminus besitzen noch eine geringe Affinität zu Glykosaminoglykanen<sup>1</sup>. Der fixierte N-Terminus scheint die Glykosaminoglykan-Bindestelle  $\alpha$ -Helix D zwar weitgehend zu blockieren, doch könnte die verbleibende Wechselwirkung von Glykosaminoglykanen an andere Bereiche des Serpins ausreichen, um Konformationsänderungen am HCII zu induzieren. Diese Konformationsänderungen könnten die reaktive Schleife von HCII besser für die Protease zugänglich machen und so die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin fördern. Auch die Bindung der Glykosaminoglykane an die Protease könnte einen Einfluss auf die Inhibitionskonstanten haben.  $\alpha$ -Thrombin bindet Glykosaminoglykane über die Exosite I und mit höherer Affinität an der Exosite II<sup>2</sup>. Beide Exosites können die Aktivität von Thrombin beeinflussen. Die Interaktion von Exosite II mit Kofaktoren kann die Struktur und Funktion des aktiven Zentrums verändern<sup>3</sup>. Ebenso wird diskutiert, dass beide Exosites in einer Beziehung zu einander stehen könnten und sich gegenseitig beeinflussen<sup>4</sup>. Es besteht die Möglichkeit, dass durch Bindung der Glykosaminoglykane an eine oder beide Exosites von  $\alpha$ -Thrombin eine Strukturänderung verursacht wird, die eine reaktivere Konformation des aktiven Zentrums induziert. Somit könnten die in Gegenwart von Glykosaminoglykanen ermittelten leicht höheren Inhibitionskonstanten der Disulfid-verbrückten HCII-Varianten aufgrund einer variierten Thrombinaktivität bedingt sein.

$\gamma$ -Thrombin ist eine Thrombin-Variante, die nicht mehr die Fähigkeit besitzt, Kofaktoren an der Exosite I zu binden<sup>5</sup>. Der allosterische Mechanismus der Hemmung durch HCII kann bei  $\gamma$ -Thrombin nicht erfolgen. Die Hemmung von  $\gamma$ -Thrombin durch HCII in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat zeigt erhöhte Inhibitionskonstanten im Vergleich zur Hemmung in Abwesenheit von Glykosaminoglykanen<sup>6</sup>. Die leicht erhöhten Inhibitionskonstanten in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat weisen möglicherweise darauf hin, dass bereits die Bindung der Glykosaminoglykane an Thrombin einen Einfluss auf die Hemmung durch HCII haben kann. Unter Umständen induzieren Glykosaminoglykane Strukturveränderungen sowohl am Serpin wie auch an der Protease, die die Inhibitionsreaktion fördern.

---

<sup>1</sup> Binkmeyer, 2001

<sup>2</sup> Verhamme *et al.*, 2004

<sup>3</sup> Liu *et al.*, 1991; Ye *et al.*, 1991; Duffy *et al.*, 1997; Fredenburgh *et al.*, 2001

<sup>4</sup> Fredenburgh *et al.*, 1997

<sup>5</sup> Hofsteenge *et al.*, 1988; Church *et al.*, 1989<sup>a</sup>

<sup>6</sup> Van Deerlin & Tollefsen, 1991; Liaw *et al.*, 1999; Hayakawa *et al.*, 2000<sup>a</sup>

### 5.3.2.3 Einflüsse der geänderten Aminosäuresequenzen auf die Inhibitionseigenschaften der HCII-Varianten

Durch Untersuchungen der Reaktion der HCII-Varianten mit  $\alpha$ -Thrombin konnte die Bedeutung der N-terminalen Domäne von HCII bewiesen werden (siehe 5.3.2.2). Bei den kinetischen Messungen zeigten die HCII-Varianten aber einige Besonderheiten. Bei allen rekombinanten Varianten von HCII, solche ohne Disulfidbrücken (rHCII F195C, rHCII  $\Delta$ C, rHCII  $\Delta$ C/F195C) wie auch für die reduzierten Doppel-Cystein-Varianten (rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C, rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C) wurden in Gegenwart von Glykosaminoglykanen Inhibitionskonstanten ermittelt, die kleiner als jene des Wildtyp-HCII (rHCII wt) waren. Das Ausmaß dieser Unterschiede war bei Heparin und Dermatansulfat jedoch sehr unterschiedlich (siehe 4.10.3). In Gegenwart von Heparin waren die Inhibitionskonstanten im Mittel um 15 % kleiner als die Konstante von Wildtyp-HCII (Tabelle 4.10-3). In Gegenwart von Dermatansulfat waren die Werte aber bis zu 90 % reduziert (Tabelle 4.10-4). Eine mögliche Erklärung für diesen Befund war, dass sich bei den Varianten eine Änderung der Affinitäten zu den Glykosaminoglykanen ergeben hat. Dies würde bedeuten, dass die Varianten ihre maximale Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin bei anderen Konzentrationen an Heparin oder Dermatansulfat erreichen als Wildtyp-HCII. Entsprechende Untersuchungen (siehe 4.10.3.1) der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin zeigten jedoch keine Veränderung der maximalen Inhibitionskonstanten. Im Fall der Dermatansulfat-aktivierten Reaktion wurden für die HCII-Varianten geringfügig höhere Dermatansulfat-Konzentrationen für die maximale Inhibition benötigt. Jedoch betrug die maximalen Inhibitionskonstanten immer noch lediglich 30 % der Konstante des Wildtyp-HCII (Abbildung 4.10-1). Daraus konnte gefolgert werden, dass eine geänderte Glykosaminoglykan-Affinität nicht die Ursache für die geringeren Inhibitionskonstanten der Varianten war.

Weitere Experimente zeigten dass die im Vergleich zu Wildtyp-HCII geringeren Inhibitionskonstanten der Varianten die Folge einer Änderung der Stöchiometrie der Inhibition (SI) waren. Es ist bekannt, dass genetisch modifizierte Serpine bei Inhibitionsreaktionen häufig höhere SI-Werte als der Wildtyp aufweisen<sup>1</sup>. Unter den Bedingungen einer Reaktionskinetik pseudo-erster Ordnung wirkt sich der SI-Wert auch auf die Inhibitionskonstante aus (siehe 4.10.3.2 und Abbildung 5.2-2). Die für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin ermittelten SI-Werte waren für die HCII-Varianten höher als für Wildtyp-HCII, sowohl in Gegenwart von Heparin wie auch von Dermatansulfat (Tabelle 4.10-5).

---

<sup>1</sup> Schechter *et al.*, 1993; Djie *et al.*, 1996; Bottomley & Stone, 1998

Die Normierung der Inhibitionskonstanten unter Einbeziehung der SI-Werte ermöglicht es, die korrekte Geschwindigkeitskonstante der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin zu bestimmen<sup>1</sup>. Eine solche Normierung zeigte für die Heparin-aktivierte Hemmung durch die HCII-Varianten Inhibitionskonstanten derselben Größenordnung wie für die Konstante von Wildtyp-HCII (Tabelle 4.10-6). Dies zeigte, dass die eingeführten Mutationen keine Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin hatten, sondern lediglich das Verhältnis zwischen inhibitorischen Pfad und Substratpfad änderten. Für die Dermatansulfat-aktivierte Hemmung ergab die Normierung keine Angleichung der Inhibitionskonstanten an die Konstante von Wildtyp-HCII. Die Mutationen in den HCII-Varianten scheinen die Dermatansulfat-vermittelte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin deutlich stärker zu beeinflussen als die Heparin-aktivierte Inhibition. Wahrscheinlich unterscheiden sich die Mechanismen der durch die beiden Glykosaminoglykane verursachten Inhibitionen, wodurch sich die Mutationen in den HCII-Varianten unterschiedlich auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin auswirken.

In Gegenwart von Dermatansulfat zeigte die Variante rHCII F195C eine um ca. 60 % kleinere Inhibitionskonstante als der Wildtyp. Der Aminosäureaustausch an dieser Position scheint eine für dieses Glykosaminoglykan spezifische Beeinflussung der Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin zu bewirken, da die Heparin-aktivierte Inhibitionsreaktion keine vom Wildtyp-HCII abweichende Konstante aufweist. Eine Erklärungsmöglichkeit dafür ist, dass die Bindestellen am HCII für Heparin und Dermatansulfat nicht identisch sind, sondern sich lediglich in einigen Bereichen überlappen<sup>2</sup> (siehe 2.2.2). Die für die Dermatansulfat-Bindung wichtigen Gruppen befinden sich im C-terminalen Bereich der  $\alpha$ -Helix D. Die basischen Aminosäuren R192 und R193 befinden sich zwischen der  $\alpha$ -Helix D und Strang 2 von  $\beta$ -Faltblatt A und haben einen starken Einfluss auf die Dermatansulfat-aktivierte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin, aber nur eine sehr geringe Wirkung auf die Heparin-aktivierte Inhibition<sup>3</sup>. Möglicherweise induziert der Austausch des großen hydrophoben Phenylalanins an Position 195 gegen Cystein eine lokale Strukturänderung, in die auch die basischen Aminosäuren an den Positionen 192 und 193 involviert sind. Dies könnte die geringere Wirkung von Dermatansulfat auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin durch rHCII F195C erklären.

---

<sup>1</sup> Gettins, 2002<sup>a</sup>; Schechter & Plotnick, 2004

<sup>2</sup> Blinder *et al.*, 1989; Blinder *et al.*, 1990; Whinna *et al.*, 1991

<sup>3</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>; Liaw *et al.*, 1999

Aber auch andere Erklärungen kommen für die Beobachtung in Frage. So zeigten verschiedene Untersuchungen des Serpins ATIII, dass die Bindung von Heparin eine Konformationsänderung der  $\alpha$ -Helix D verursacht, die auch die Konformation der reaktiven Schleife beeinflusst<sup>1</sup>. Die Konformationsänderung verläuft über eine Wechselwirkung zwischen der Heparin-Bindestelle und dem proximalen Scharnier der reaktiven Schleife. Letztere ist im nativen Zustand von ATIII partiell in die Struktur vom  $\beta$ -Faltblatt A inseriert und wird erst bei der Bindung von Heparin vollständig exponiert<sup>2</sup>. Ein solcher Vorgang kann auch beim HCII angenommen werden. Die Röntgenstruktur von nativem HCII zeigt, dass ein Teil der reaktiven Schleife als zusätzlicher Strang (s4A) in das  $\beta$ -Faltblatt A integriert ist. Im Michaelis-Komplex zwischen HCII und S195A-Thrombin existiert dieser zusätzliche Strang aber nicht mehr und die reaktive Schleife ist stärker exponiert (Abbildung 5.3-1)<sup>3</sup>. Somit besteht die Möglichkeit, dass auch beim HCII eine Wechselwirkung zwischen der  $\alpha$ -Helix D und der reaktiven Schleife besteht, welche bei der Variante rHCII F195C möglicherweise verändert ist. Infolgedessen könnte die Exposition der reaktiven Schleife nicht vollständig erfolgen und dies könnte sich auf die Dermatansulfat-aktivierte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin auswirken. Konkretisiert werden diese Überlegungen durch Untersuchungen am ATIII, die belegen, dass die Verbindungsschleife zwischen der  $\alpha$ -Helix D und dem Strang 2 von  $\beta$ -Faltblatt A eine besondere Rolle bei der Aktivierung von ATIII spielt. Konformationsänderungen der  $\alpha$ -Helix D sollen dabei über diese Verbindungsschleife auf die reaktive Schleife übertragen werden<sup>4</sup>. Bei diesem Vorgang soll die Position 134 im ATIII eine besondere Bedeutung haben, die der Position 194 im HCII entspricht. Überträgt man die Ergebnisse der Untersuchungen am ATIII, so befände sich bei der Variante rHCII F195C die Mutation in einer für die Aktivierung des Serpins kritischen Region (Abbildung 5.3-1). Es ist auch möglich, dass bei der Variante rHCII F195C die Insertion der reaktiven Schleife als zusätzlicher Strang in das  $\beta$ -Faltblatt A von HCII erschwert ist. Eine solche Störung würde die Fähigkeit von HCII zur Inhibition von  $\alpha$ -Thrombin stark beeinflussen. Aus den Betrachtungen lässt sich aber nicht erklären, warum die Mutation F195C nur die Dermatansulfat-aktivierte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin betrifft, die entsprechende Heparin-aktivierte Inhibition jedoch unbeeinflusst lässt.

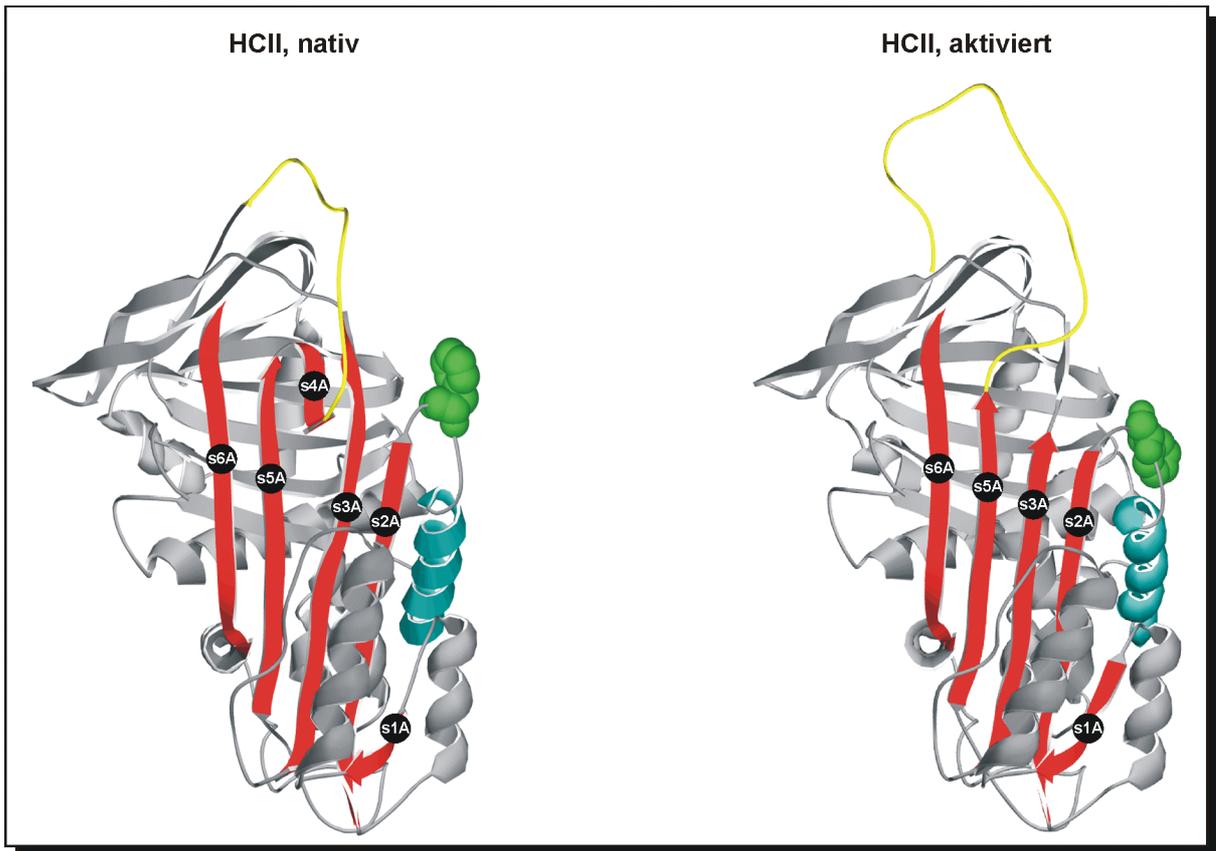
---

<sup>1</sup> Jin *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1997

<sup>2</sup> Skinner *et al.*, 1997; Huntington *et al.*, 2000<sup>a</sup>; Whisstock *et al.*, 2000

<sup>3</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>4</sup> Meagher *et al.*, 2000



**Abbildung 5.3-1:** Bänderdiagramme der Strukturen von nativem HCII (AS 95-480, PDB ID 1JMJ, A) und von aktiviertem HCII (AS 95-480, PDB ID 1JMO) nach den Röntgenstrukturen von Baglin *et al.*, 2002. Die Struktur von aktivem HCII wurde dem Michaelis-Komplex mit S195A-Thrombin entnommen. Gelb: reaktive Schleife; rot:  $\beta$ -Faltblatt A; cyan:  $\alpha$ -Helix D; grün: F195 (Kalottendarstellung). Die Aktivierung von HCII beinhaltet eine Konformationsänderung der reaktiven Schleife unter Änderung des  $\beta$ -Faltblatts A von einer 6-strängigen zu einer 5-strängigen Struktur.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigte nicht nur die HCII-Variante rHCII F195C eine geänderte Dermatansulfat-aktivierte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin. Auch die Cystein-freie Variante rHCII  $\Delta$ C und alle von ihr abgeleiteten Varianten zeigten eine stark reduzierte Inhibitionsfähigkeit in Gegenwart von Dermatansulfat (Tabelle 4.10-4). Die natürlichen Cysteine sind bei allen bislang charakterisierten Vertebraten konserviert <sup>1</sup>, wurden bei der Konstruktion von HCII-Varianten aber durch Seringruppen ersetzt um eine mögliche Wechselwirkung mit den neu eingeführten Cysteinen zu verhindern <sup>2</sup>. Humanes HCII besitzt drei natürliche Cysteine an den Positionen 273, 323 und 467, bildet aber keine Disulfidbrücken aus. Zudem hatten Untersuchungen gezeigt, dass die Cysteine keinen Einfluss auf die Heparin-aktivierte Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin haben (siehe auch Tabelle 4.10-3) und es wurde vermutet, dass die Cysteine eine strukturelle Funktion haben könnten <sup>3</sup>. Der Sequenz von humanem HCII ist zu entnehmen, dass von den drei natürlichen Cysteinen die an den

<sup>1</sup> Ragg, 1986; Sheffield *et al.*, 1994; Westrup & Ragg, 1994; Zhang *et al.*, 1994; Colwell & Tollefsen, 1998

<sup>2</sup> Brinkmeyer, 2001

<sup>3</sup> Church *et al.*, 1987

Positionen 273 und 467 von hydrophoben Aminosäuren flankiert sind<sup>1</sup> (siehe auch 7.3). Nach Hopp und Woods<sup>2</sup> ist Cystein als hydrophob, Serin aber als hydrophil einzuordnen, mit Hydrophilizitätswerten von -1,0 bzw. 0,3 (innerhalb einer Skala von -3,4 bis 3,0). Hydrophobizitäts-Plots von HCII (ProtScale, ExPASy) belegen, dass die Hydrophobizität in den Bereichen um die Positionen 273 und 467 um 30-40 % abnimmt, wenn die entsprechenden Cysteine gegen Serin ausgetauscht werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Position 467 im humanen HCII befindet sich am N-terminalen Bereich von Strang 2 des  $\beta$ -Faltblatts B (siehe Abbildung 5.3-2, A) und wird von den hydrophoben Aminosäuren T465 und L469 flankiert. Dieser Bereich des  $\beta$ -Faltblatts B befindet sich in Nachbarschaft zur C-terminalen Region der Glykosaminoglykan-Bindestelle  $\alpha$ -Helix D, mit den Aminosäuren L186 und L190, die in die hydrophobe Region hineinreichen (siehe Abbildung 5.3-2, B).

An der hydrophoben Wechselwirkung ist vermutlich auch das Leucin an Position 199 in der Verbindungsschleife zwischen der  $\alpha$ -Helix D und dem Strang 2 von  $\beta$ -Faltblatt A beteiligt. Es besteht die Möglichkeit, dass infolge der Mutation der Variante rHCII  $\Delta$ C die Änderung der Hydrophobizität eine Konformationsänderung der C-terminalen Region der  $\alpha$ -Helix D induziert wird. In dieser Region sind die basischen Aminosäuren R189, R192 und R193 lokalisiert, die mit Dermatansulfat interagieren, jedoch weniger oder gar nicht mit Heparin wechselwirken (Abbildung 2.2-1). Änderungen in dieser Region der Glykosaminoglykan-Bindestelle könnten somit die Interaktion von HCII mit Dermatansulfat erschweren. Auch eine Auswirkung auf die Verbindungsschleife zwischen der  $\alpha$ -Helix D und dem Strang 2 vom  $\beta$ -Faltblatt A ist möglich. Wie schon zuvor beschrieben, hat diese Region bei ATIII einen Einfluss auf die Expulsion der reaktiven Schleife bei der Aktivierung von ATIII durch Heparin<sup>3</sup>. Es ist möglich, dass diese strukturellen Vorgänge die geringere Aktivität der Variante rHCII  $\Delta$ C in Gegenwart von  $\alpha$ -Thrombin verursachen.

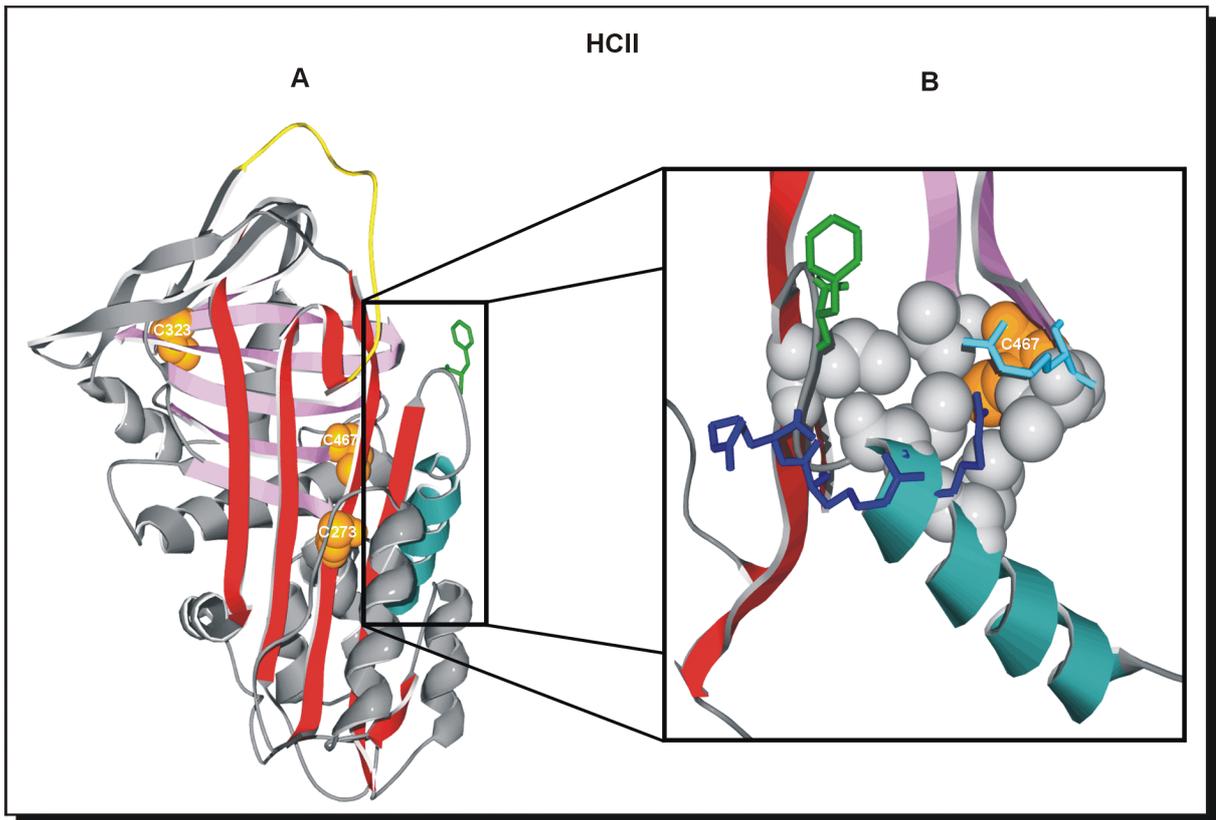
Für die basischen Aminosäuren R189, R192 und R193 ist belegt, dass sie für die Interaktion zwischen HCII und Dermatansulfat von Bedeutung sind. In Abbildung 5.3-2 B, ist zu erkennen, dass sich in derselben Region auch die Aminosäure R464 befindet. Diese ist zwischen Strang 2 und 3 von  $\beta$ -Faltblatt B lokalisiert, direkt vor Cystein C467. Eine Funktion von R464 bei der Bindung von Glykosaminoglykanen ist bislang nicht beschrieben. Doch kann aufgrund seiner räumlichen Nähe zu den anderen basischen Gruppen, für die eine Bedeutung belegt ist, vermutet werden, dass auch R464 an der Wechselwirkung zwischen HCII und Dermatansulfat beteiligt ist. Die Mutation an Position 467 könnte eine solche Wechselwirkung negativ beeinflussen.

---

<sup>1</sup> Ragg, 1986

<sup>2</sup> Hopp & Woods, 1981

<sup>3</sup> Meagher *et al.*, 2000



**Abbildung 5.3-2:** Bild A: Bänderdiagramm der Struktur von nativem HCII (AS 95-480, PDB ID 1JMJ, A). Farblich dargestellt sind folgende Strukturelemente: reaktive Schleife (gelb),  $\beta$ -Faltblatt A (rot),  $\beta$ -Faltblatt B (magenta),  $\alpha$ -Helix D (cyan), F195 (grün); natürliche Cysteine C273, C323, C467 (orange, Kalottendarstellung). Bild B: Gedrehter Bildausschnitt der Region um die  $\alpha$ -Helix D (cyan). Die hydrophoben Aminosäuren (L186, L190, L199, T465, L469) im Bereich zwischen  $\alpha$ -Helix D und Strang s2B sind grau dargestellt (Kalottendarstellung), das Cystein C467 auf Strang s2B in orange. Die basischen Aminosäuren mit Bedeutung für die Dermatan-sulfat-Bindung (R189, R192, R193) sind in dunkelblau abgebildet, R464 in hellblau. Zur besseren Übersicht sind andere Elemente der HCII-Struktur ausgeblendet.

Die Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C zeigte unter reduzierenden Bedingungen eine geringere Aktivität gegenüber  $\alpha$ -Thrombin als die anderen Doppel-Cystein-Varianten rHCII  $\Delta$ C/P52C/F195C und rHCII  $\Delta$ C/G54C/F195C (Tabelle 4.10-2 bis Tabelle 4.10-4). Der N-terminale Aminosäureaustausch in der Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C befindet sich im zweiten negativ geladenen Bereich AR2 (Positionen 63-75), bei den beiden anderen Varianten im ersten negativen Bereich AR1 (Positionen 49-62). Die unterschiedliche Reaktivität muss mit der Position 68 im N-Terminus von HCII in Verbindung stehen. Es wurde bereits vermutet, dass der zweite negativ geladene Bereich (AR2) eine Rolle bei der Interaktion mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin spielt<sup>1</sup> und es wurde gezeigt, dass eine Mutation an der Position 67 oder 68 die Aktivität des Serpins reduziert. Dieser Einfluss ist unabhängig von der Abwesenheit oder Anwesenheit von Glykosaminoglykanen<sup>2</sup>. Der Michaelis-Komplex zwischen HCII und S195A-Thrombin zeigt eine Interaktion der Exosite I von

<sup>1</sup> Mitchell & Church, 2002

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a</sup>

S195A-Thrombin mit dem N-Terminus von HCII, an der auch die Aminosäuren F67 und D70 von HCII beteiligt sind<sup>1</sup> (siehe Abbildung 2.2-5).

In dieser Arbeit wurden die HCII-Varianten für kinetische Untersuchungen reduziert und mit Iodacetamid alkyliert. Bei der Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C hat der Aminosäureaustausch an Position 68 und/oder die Alkylierung dieser Position einen negativen Effekt auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin (Tabelle 4.10-3 und 4.10-4). Möglicherweise hat ein alkyliertes Cystein an Position 68 einen Einfluss auf die Aminosäuren F67 und D70 und stört die Interaktion des N-Terminus von HCII mit der Exosite I von  $\alpha$ -Thrombin. Dies könnte die verringerte Aktivität der Variante rHCII  $\Delta$ C/S68C/F195C gegenüber  $\alpha$ -Thrombin erklären.

### 5.3.3 Zusammenfassende Betrachtung zum Einfluss der N-terminalen Domäne von HCII auf die Hemmung von $\alpha$ -Thrombin

Ein wichtiger Teilbereich dieser Arbeit war die nähere Charakterisierung der N-terminalen Domäne von HCII und ihre Bedeutung für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin. Es konnte gezeigt werden, dass eine freie Beweglichkeit des N-Terminus für die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Heparin oder Dermatansulfat - und in geringem Maße auch in Abwesenheit der Glykosaminoglykane - essentiell ist. Eine kovalente Fixierung des N-Terminus mit Hilfe einer Disulfidbrücke am globulären Proteinzentrum führte zu einer drastischen Reduzierung der inhibitorischen Aktivität von HCII gegenüber  $\alpha$ -Thrombin. Eine Reduktion der Disulfidbrücke stellte die Aktivität vollständig wieder her. Dies unterstützt die Vorstellung vom Doppelbrücken- wie auch dem allosterischen Mechanismus der Inhibition, wie sie für HCII postuliert wurden<sup>2</sup>. Dies bedeutet, dass eine Änderung der Konformation von HCII und eine Translokation des N-Terminus von essentieller Bedeutung bei der Aktivierung von HCII durch Glykosaminoglykane sind. Die Funktionalität der Disulfid-verbrückten HCII-Varianten konnte in Inhibitionsversuchen mit  $\alpha$ -Chymotrypsin belegt werden, die zeigten, dass die reaktive Schleifen der Varianten für eine Protease zugänglich waren.

Bislang wurde davon ausgegangen, dass im nativen HCII der N-Terminus durch ionische Wechselwirkungen an der basischen  $\alpha$ -Helix D lokalisiert ist. Dabei fungiert der negative geladene Bereich AR2 in der N-terminalen Domäne von HCII als intramolekulares Analogon eines Glykosaminoglykans<sup>3</sup>. Die Daten der HCII-Röntgenkristallographie konnten weder diese Wechselwirkung noch die Struktur oder Position des N-Terminus am globulären Proteinzentrum bestimmen<sup>4</sup>. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der N-Terminus von HCII über drei verschiedene Positionen (Positionen 52, 54 und 68) an der

---

<sup>1</sup> Baglin *et al.*, 2002

<sup>2</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Sheehan *et al.*, 1994; Myles *et al.*, 1998; Liaw *et al.*, 1999; Holland *et al.*, 2000; Fortenberry *et al.*, 2004

<sup>3</sup> Ragg *et al.*, 1990<sup>a, b</sup>; Van Deerlin & Tollefsen, 1991

<sup>4</sup> Baglin *et al.*, 2002

$\alpha$ -Helix D-nahen Position 195 fixiert werden konnte. Diese spricht für eine Interaktion des sauren N-Terminus mit der basischen  $\alpha$ -Helix D. Die Fixierung über drei verschiedene Positionen zeigt auch das hohe Maß an Variabilität dieser Interaktion. Eine Ursache könnte die fehlende strukturelle Ordnung des N-Terminus sein, wie sie auch bei der Wechselwirkung zwischen HCII und den divalenten Zinkionen diskutiert wurde (siehe 5.2.5).

In dieser Arbeit wurde zusätzlich festgestellt, dass das Phenylalanin 195 zwischen der  $\alpha$ -Helix D und dem Strang 2 vom  $\beta$ -Faltblatt A, sowie die natürlichen Cysteine im HCII eine größere Bedeutung haben als bisher angenommen. Beide Faktoren wirken sich auf die Aktivierung von HCII durch Dermatansulfat aus, aber kaum auf die Hemmung von  $\alpha$ -Thrombin in Gegenwart von Heparin. Möglicherweise hat die Verbindungsschleife zwischen der  $\alpha$ -Helix D und dem Strang 2 von  $\beta$ -Faltblatt A eine Wirkung auf die reaktive Schleife und die Aktivität von HCII, in Analogie zu Befunden bei ATIII<sup>1</sup>. Die Ergebnisse zeigen aber zweifelsfrei die Unterschiede in den Mechanismen der HCII-Aktivierung durch Heparin bzw. Dermatansulfat. Die Ergebnisse in Gegenwart von Dermatansulfat sind von erheblicher physiologischer Relevanz, da Glykosaminoglykane wie Dermatansulfat eher als physiologische Kofaktoren für HCII in Betracht kommen. Daher besteht die Notwendigkeit, den Mechanismus der HCII-Aktivierung durch Dermatansulfat weiter zu charakterisieren.

---

<sup>1</sup> Meagher *et al.*, 2000

# Kapitel 6

## Literaturverzeichnis

Abildgaard U, Larsen ML (1984)

Assay of dermatan sulfate cofactor (heparin cofactor II) activity in human plasma.  
Thromb. Res. **35**, 257-66.

Accoceberry I, Thellier M, Desportes-Livage I, Achbarou A, Biligui S, Danis M, Datry A (2001)

One-step purification of *Enterocytozoon bieneusi* spores from human stools by immunoaffinity expanded-bed adsorption.  
J. Clin. Microbiol. **39**, 1947-1951.

Aihara K, Azuma H, Takamori N, Kanagawa Y, Akaike M, Fujimura M, Yoshida T, Hashizume S, Kato M, Yamaguchi H, Kato S, Ikeda Y, Arase T, Kondo A, Matsumoto T (2004)

Heparin cofactor II is a novel protective factor against carotid atherosclerosis in elderly individuals.  
Circulation **109**, 2761-2765.

Alberts IL, Nadassy K, Wodak SJ (1998)

Analysis of zinc binding sites in protein crystal structures.  
Protein Sci. **7**, 1700-1716.

Alt FW, Kellems RE, Bertino JR, Schimke RT (1978)

Selective amplification of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells.  
J. Biol. Chem. **252**, 1357-1370.

Amersham Biosciences (2003<sup>a</sup>)

Efficient Detection of Biomolecules by Autoradiography, Fluorography or Chemiluminescence.  
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg.

Amersham Biosciences (2003<sup>b</sup>)

Antibody Purification Handbook.  
Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg.

Andersson TR, Sie P, Pelzer H, Aamodt LM, Nustad K, Abildgaard U (1992)

Elevated levels of thrombin-heparin cofactor II complex in plasma from patients with disseminated intravascular coagulation.  
Thromb. Res. **66**, 591-598.

- Andersson T, Lorentzen B, Hogdahl H, Clausen T, Mowinckel MC, Abildgaard U (1996)  
Thrombin-inhibitor complexes in the blood during and after delivery.  
*Thromb. Res.* **82**, 109-117.
- Andrew M, Mitchell L, Berry L, Paes B, Delorme M, Ofosu F, Burrows R, Khambalia B (1992)  
An anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan circulates in the pregnant woman and her fetus.  
*J. Clin. Invest.* **89**, 321-326.
- Arteel GE, Franken S, Kappler J, Sies H (2000)  
Binding of selenoprotein P to heparin: characterization with surface plasmon resonance.  
*Biol. Chem.* **381**, 265-268.
- Atha DH, Lormeau JC, Petitou M, Rosenberg RD, Choay J (1985)  
Contribution of monosaccharide residues in heparin binding to antithrombin III.  
*Biochemistry* **24**, 6723-6729.
- Baglin TP, Carrell RW, Church FC, Esmon CT, Huntington JA (2002)  
Crystal structures of native and thrombin-complexed heparin cofactor II reveal a multistep allosteric mechanism.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 11079-11084.
- Baksh S, Spamer C, Oikawa K, McCubbin WD, Heilmann C, Kay CM, Michalak M (1995)  
Zn<sup>2+</sup> binding to cardiac calsequestrin.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **209**, 310-315.
- Barnes WM (1977)  
Plasmid detection and sizing in single colony lysates.  
*Science* **195**, 393-394.
- Bauman SJ, Church FC (1999)  
Enhancement of heparin cofactor II anticoagulant activity.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 34556-34565.
- Becker DL, Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI (1999)  
Exosites 1 and 2 are essential for protection of fibrin-bound thrombin from heparin-catalyzed inhibition by antithrombin and heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 6226-6233.
- Belew M, Yip TT, Andersson L, Ehrnstrom R (1987)  
High-performance analytical applications of immobilized metal ion affinity chromatography.  
*Anal. Biochem.* **164**, 457-465.
- Bendayan P, Boccalon H, Dupouy D, Boneu B (1994)  
Dermatan sulfate is a more potent inhibitor of clot-bound thrombin than unfractionated and low molecular weight heparins.  
*Thromb. Haemost.* **71**, 576-580.
- Bender ML, Kezdy FJ, Feder J (1965)  
The kinetics of the trypsin-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl alpha-N-benzoyloxycarbonyl-L-lysinate hydrochloride.  
*J. Am. Chem. Soc.* **87**, 4953-4954.

- Bender ML, Begue-Canton ML, Blakeley RL, Brubacher LJ, Feder J, Gunter CR, Kezdy FJ, Killheffer JV Jr, Marshall TH, Miller CG, Roeske RW, Stoops JK (1966)  
The determination of the concentration of hydrolytic enzyme solutions: alpha-chymotrypsin, trypsin, papain, elastase, subtilisin, and acetylcholinesterase.  
*J. Am. Chem. Soc.* **88**, 5890-5913.
- Bender ML, Kezdy FJ, Wedler FC (1967)  
Alpha-chymotrypsin: enzyme concentration and kinetics.  
*J. Chem. Educ.* **44**, 84-88.
- Bernardo MM, Day DE, Halvorson HR, Olson ST, Shore JD (1993)  
Surface-independent acceleration of factor XII activation by zinc ions. II. Direct binding and fluorescence studies.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 12477-12483.
- Biacore (2002)  
BIAcore 3000 Instrument Handbook, Biacore.  
Biacore International AB, Uppsala, Schweden.
- Bieth JG (1995)  
Theoretical and practical aspects of proteinase inhibition kinetics.  
*Methods Enzymol.* **248**, 59-84.
- Bio-Rad Laboratories (2001)  
Instruction Manual, Quantum Prep Plasmid Miniprep Kit, Rev F.  
Bio-Rad Laboratories GmbH, München.
- Birnboim HC, Doly J (1979)  
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.  
*Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bjork I, Lindahl U (1982)  
Mechanism of the anticoagulant action of heparin.  
*Mol. Cell. Biochem.* **48**, 161-182.
- Björk I, Olson ST, Sheffer RG, Shore JD (1989)  
Binding of heparin to human high molecular weight kininogen.  
*Biochemistry* **28**, 1213-1221.
- Blinder MA, Marasa JC, Reynolds CH, Deaven LL, Tollefsen DM (1988)  
Heparin cofactor II: cDNA sequence, chromosome localization, restriction fragment length polymorphism, and expression in *Escherichia coli*.  
*Biochemistry* **27**, 752-759.
- Blinder MA, Andersson TR, Abildgaard U, Tollefsen DM (1989)  
Heparin cofactor II<sub>Oslo</sub>. Mutation of Arg-189 to His decreases the affinity for dermatan sulfate.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 5128-5133.
- Blinder MA, Tollefsen DM (1990)  
Site-directed mutagenesis of arginine 103 and lysine 185 in the proposed glycosaminoglycan-binding site of heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 286-291.
- Bock PE, Olson ST, Bjork I (1997)  
Inactivation of thrombin by antithrombin is accompanied by inactivation of regulatory exosite I.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 19837-19845.

- Bode W, Mayr I, Baumann U, Huber R, Stone SR, Hofsteenge J (1989)  
The refined 1.9 Å crystal structure of human alpha-thrombin: interaction with D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone and significance of the Tyr-Pro-Pro-Trp insertion segment.  
*EMBO J.* **8**, 3467-3475.
- Bode W, Huber R (1992)  
Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases.  
*Eur. J. Biochem.* **204**, 433-451.
- Bode W, Turk D, Karshikov A (1992)  
The refined 1.9-Å X-ray crystal structure of D-Phe-Pro-Arg chloromethylketone-inhibited human alpha-thrombin: structure analysis, overall structure, electrostatic properties, detailed active-site geometry, and structure-function relationships.  
*Protein Sci.* **1**, 426-471.
- Böhme C (2001)  
Untersuchungen zur Wechselwirkung von Heparinkofaktor II aus Plasma und rekombinanten Zellen mit Glykosaminoglykanen.  
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Böhme C, Nimtz M, Grabenhorst E, Conradt HS, Strathmann A, Ragg H (2002)  
Tyrosine sulfation and N-glycosylation of human heparin cofactor II from plasma and recombinant Chinese hamster ovary cells and their effects on heparin binding.  
*Eur. J. Biochem.* **269**, 977-988.
- Borza DB, Morgan WT (1998)  
Histidine-proline-rich glycoprotein as a plasma pH sensor. Modulation of its interaction with glycosaminoglycans by pH and metals.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 5493-5499.
- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W (1985)  
A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus.  
*Cell* **41**, 521-530.
- Boskovic DS, Giles AR, Nesheim ME (1990)  
Studies of the role of factor Va in the factor Xa-catalyzed activation of prothrombin, fragment 1.2-prethrombin-2, and dansyl-L-glutamyl-glycyl-L-arginine-meizothrombin in the absence of phospholipid.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 10497-10505.
- Bottomley SP, Stone SR (1998)  
Protein engineering of chimeric Serpins: an investigation into effects of the serpin scaffold and reactive centre loop length.  
*Protein Eng.* **11**, 1243-1247.
- Bourin MC, Lindahl U (1993)  
Glycosaminoglycans and the regulation of blood coagulation.  
*Biochem. J.* **289**, 313-330.
- Brand IA, Heinickel A, Kratzin H, Soling HD (1988)  
Properties of a 19-kDa Zn<sup>2+</sup>-binding protein and sequence of the Zn<sup>2+</sup>-binding domains.  
*Eur. J. Biochem.* **177**, 561-568.
- Brandt A, Svendsen I, Hejgaard J (1990)  
A plant serpin gene. Structure, organization and expression of the gene encoding barley protein Z4.  
*Eur. J. Biochem.* **194**, 499-505.

- Bray B, Lane DA, Freyssinet JM, Pejler G, Lindahl U (1989)  
Anti-thrombin activities of heparin. Effect of saccharide chain length on thrombin inhibition by heparin cofactor II and by antithrombin.  
*Biochem. J.* **262**, 225-232.
- Briginshaw GF, Shanberge JN (1974)  
Identification of two distinct heparin cofactors in human plasma. Separation and partial purification.  
*Arch. Biochem. Biophys.* **161**, 683-690.
- Brinkmeyer S (2001)  
Experimente zur Aktivierung von Heparinkofaktor II durch Heparin und Dermatansulfat unter Verwendung eines reversiblen molekularen Schalters.  
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Brister SJ, Ofosu FA, Heigenhauser GJ, Gianese F, Buchanan MR (1994)  
Is heparin the ideal anticoagulant for cardiopulmonary bypass? Dermatan sulphate may be an alternate choice.  
*Thromb. Haemost.* **71**, 468-473.
- Brocklehurst K, Resmini M, Topham CM (2001)  
Kinetic and titration methods for determination of active site contents of enzyme and catalytic antibody preparations.  
*Methods* **24**, 153-167.
- Brockhinke A., Plessow R., Dittrich P., Kohse-Höinghaus K (2000)  
Analysis of the local conformation of proteins with two-dimensional fluorescence techniques.  
*Appl. Phys. B* **71**, 755-763
- Bruch M, Weiss V, Engel J (1988)  
Plasma serine proteinase inhibitors (serpins) exhibit major conformational changes and a large increase in conformational stability upon cleavage at their reactive sites.  
*J. Biol. Chem.* **263**, 16626-16630.
- Buller RM, Palumbo GJ (1991)  
Poxvirus pathogenesis.  
*Microbiol. Rev.* **55**, 80-122.
- Burnette WN (1981)  
"Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.  
*Anal. Biochem.* **112**, 195-203.
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K, Masters CL (1993)  
A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer's disease.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 16109-16112.
- Bush AI, Pettingell WH Jr, de Paradis M, Tanzi RE, Wasco W (1994)  
The amyloid beta-protein precursor and its mammalian homologues. Evidence for a zinc-modulated heparin-binding superfamily.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 26618-26621.

- Cabrita LD, Dai W, Bottomley SP (2004)  
Different conformational changes within the F-helix occur during serpin folding, polymerization, and proteinase inhibition.  
*Biochemistry* **43**, 9834-9839.
- Calugaru SV, Swanson R, Olson ST (2001)  
The pH dependence of serpin-proteinase complex dissociation reveals a mechanism of complex stabilization involving inactive and active conformational states of the proteinase which are perturbable by calcium.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 32446-32455.
- Capecchi MR (1980)  
High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.  
*Cell* **22**, 479-488.
- Carrell R, Travis J (1985)  
 $\alpha_1$ -Antitrypsin and the Serpins: variation and countervariations.  
*Trends Biochem. Sci.* **10**, 20-24.
- Carrell RW, Owen MC (1985)  
Plakalbumin, alpha 1-antitrypsin, antithrombin and the mechanism of inflammatory thrombosis.  
*Nature* **317**, 730-732.
- Carrell RW, Stein PE, Fermi G, Wardell MR (1994)  
Biological implications of a 3 A structure of dimeric antithrombin.  
*Structure* **2**, 257-270.
- Casu B, Oreste P, Torri G, Zoppetti G, Choay J, Lormeau JC, Petitou M, Sinay P (1981)  
The structure of heparin oligosaccharide fragments with high anti-(factor Xa) activity containing the minimal antithrombin III-binding sequence. Chemical and <sup>13</sup>C nuclear-magnetic-resonance studies.  
*Biochem. J.* **197**, 599-609.
- Chappell DA, Fry GL, Waknitz MA, Muhonen LE, Pladet MW, Iverius PH, Strickland DK (1993)  
Lipoprotein lipase induces catabolism of normal triglyceride-rich lipoproteins via the low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in vitro. A process facilitated by cell-surface proteoglycans.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 14168-14175.
- Chakraborty S, Ittah V, Bai P, Luo L, Haas E, Peng Z (2001)  
Structure and dynamics of the alpha-lactalbumin molten globule: fluorescence studies using proteins containing a single tryptophan residue.  
*Biochemistry* **40**, 7228-7238.
- Chavakis T, May AE, Preissner KT, Kanse SM (1999)  
Molecular mechanisms of zinc-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor and beta2-integrins.  
*Blood* **93**, 2976-2983.
- Chen VC, Chao L, Pimenta DC, Bledsoe G, Juliano L, Chao J (2001)  
Identification of a major heparin-binding site in kallistatin.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 1276-1284.
- Chichkova NV, Evstafieva AG, Lyakhov IG, Tsvetkov AS, Smirnova TA, Karapetian RN, Karger EM, Vartapetian AB (2000)  
Divalent metal cation binding properties of human prothymosin alpha.  
*Eur. J. Biochem.* **267**, 4745-4752.

- Choay J, Petitou M, Lormeau JC, Sinay P, Casu B, Gatti G (1983)  
Structure-activity relationship in heparin: a synthetic pentasaccharide with high affinity for antithrombin III and eliciting high anti-factor Xa activity.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **116**, 492-499.
- Church FC, Noyes CM, Griffith MJ (1985)  
Inhibition of chymotrypsin by heparin cofactor II.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 6431-6434.
- Church FC, Villanueva GB, Griffith MJ (1986)  
Structure-function relationships in heparin cofactor II: chemical modification of arginine and tryptophan and demonstration of a two-domain structure.  
*Arch. Biochem. Biophys.* **246**, 175-184.
- Church FC, Meade JB, Pratt CW (1987)  
Structure-function relationships in heparin cofactor II: spectral analysis of aromatic residues and absence of a role for sulfhydryl groups in thrombin inhibition.  
*Arch. Biochem. Biophys.* **259**, 331-340.
- Church FC, Pratt CW, Noyes CM, Kalayanamit T, Sherrill GB, Tobin RB, Meade JB (1989<sup>a</sup>)  
Structural and functional properties of human alpha-thrombin, phosphopyridoxylated alpha-thrombin, and gamma T-thrombin. Identification of lysyl residues in alpha-thrombin that are critical for heparin and fibrin(ogen) interactions  
*J. Biol. Chem.* **264**, 18419-18425.
- Church FC, Meade JB, Treanor RE, Whinna HC (1989<sup>b</sup>)  
Antithrombin activity of fucoidan. The interaction of fucoidan with heparin cofactor II, antithrombin III, and thrombin.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 3618-3623.
- Ciaccia AV, Cunningham EL, Church FC (1995)  
Characterization of recombinant heparin cofactor II expressed in insect cells.  
*Protein Expr. Purif.* **6**, 806-812.
- Ciaccia AV, Willemze AJ, Church FC (1997)  
Heparin promotes proteolytic inactivation by thrombin of a reactive site mutant (L444R) of recombinant heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 888-893.
- Colwell NS, Tollefsen DM (1998)  
Isolation of frog and chicken cDNAs encoding heparin cofactor II.  
*Thromb. Haemost.* **80**, 784-790.
- Colwell NS, Grupe MJ, Tollefsen DM (1999)  
Amino acid residues of heparin cofactor II required for stimulation of thrombin inhibition by sulphated polyanions.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1431**, 148-156.
- Cooperman BS, Stavridi E, Nickbarg E, Rescorla E, Schechter NM, Rubin H (1993)  
Antichymotrypsin interaction with chymotrypsin. Partitioning of the complex.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 23616-23625.
- Corkey BE, Duszynski J, Rich TL, Matschinsky B, Williamson JR (1986)  
Regulation of free and bound magnesium in rat hepatocytes and isolated mitochondria.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 2567-2574.

- Corral J, Aznar J, Gonzalez-Conejero R, Villa P, Minano A, Vaya A, Carrell RW, Huntington JA, Vicente V (2004)  
Homozygous deficiency of heparin cofactor II: relevance of P17 glutamate residue in serpins, relationship with conformational diseases, and role in thrombosis.  
*Circulation* **110**, 1303-1307.
- Cummins PM, Pabon A, Margulies EH, Glucksman MJ (1999)  
Zinc coordination and substrate catalysis within the neuropeptide processing enzyme endopeptidase EC 3.4.24.15. Identification of active site histidine and glutamate residues.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 16003-16009.
- Dafforn TR, Mahadeva R, Elliott PR, Sivasothy P, Lomas DA (1999)  
A kinetic mechanism for the polymerization of alpha1-antitrypsin.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 9548-9555.
- Dagert M, Ehrlich SD (1979)  
Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells.  
*Gene* **6**, 23-28.
- Darby N, Creighton TE (1997)  
Probing protein folding and stability using disulfide bonds.  
*Mol. Biotechnol.* **7**, 57-77.
- Davankov VA, Rogozhin SV, Semechkin AV, Baranov VA, Sannikova GS (1974)  
Ligand-exchange chromatography of racemates. Influence of temperature and concentration of eluent on ligand-exchange chromatography.  
*J. Chromatogr.* **93**, 363-367.
- Davis AR, Mascolo PL, Quinn MT (1999)  
Rapid miniprep of plasmid DNA for screening multiple colonies.  
*Bio. Techniques* **26**, 66-68.
- de Lima MC, Simoes S, Pires P, Gaspar R, Slepishkin V, Duzgunes N (1999)  
Gene delivery mediated by cationic liposomes: from biophysical aspects to enhancement of transfection.  
*Mol. Membr. Biol.* **16**, 103-109.
- DeLa Cadena RA, Colman RW (1992)  
The sequence HGLGHGHEQQHGLGHGH in the light chain of high molecular weight kininogen serves as a primary structural feature for zinc-dependent binding to an anionic surface.  
*Protein Sci.* **1**, 151-160.
- Della-Penna D, Christofferson R.E, Bennett AB (1986)  
Biotinylated proteins as molecular weight standards on Western blots.  
*Anal. Biochem.* **152**, 329-332.
- Delorme MA, Xu L, Berry L, Mitchell L, Andrew M (1998)  
Anticoagulant dermatan sulfate proteoglycan (decorin) in the term human placenta.  
*Thromb. Res.* **90**, 147-153.
- Dementiev A, Petitou M, Herbert JM, Gettins PG (2004)  
The ternary complex of antithrombin-anhydrothrombin-heparin reveals the basis of inhibitor specificity.  
*Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 863-867.

- Derechin VM, Blinder MA, Tollefsen DM (1990)  
Substitution of arginine for Leu444 in the reactive site of heparin cofactor II enhances the rate of thrombin inhibition.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 5623-5628.
- Desai UR, Johns JL, Lahaye L, Wright HT (2002)  
Probing reactive center loop insertion in serpins: a simple method for ovalbumin.  
*Anal. Biochem.* **302**, 81-87.
- De Taeye B, Compennolle G, Dewilde M, Biesemans W, Declerck PJ (2003)  
Immobilization of the distal hinge in the labile serpin plasminogen activator inhibitor 1: identification of a transition state with distinct conformational and functional properties.  
*J. Biol. Chem.* **278**, 23899-23905.
- Devlin GL, Chow MK, Howlett GJ, Bottomley SP (2002)  
Acid Denaturation of alpha1-antitrypsin: characterization of a novel mechanism of serpin polymerization.  
*J. Mol. Biol.* **324**, 859-870.
- Di Carlo V, Agnelli G, Prandoni P, Coccheri S, Gensini GF, Gianese F, Mannucci PM (1999)  
Dermatan sulphate for the prevention of postoperative venous thromboembolism in patients with cancer. DOS (Dermatan sulphate in Oncologic Surgery) Study Group.  
*Thromb. Haemost.* **82**, 30-34.
- Ding Z, Xu Y (1995)  
A rapid simplified purification of bovine thrombin.  
*Prep. Biochem.* **25**, 21-28.
- Djie MZ, Le Bonniec BF, Hopkins PC, Hipler K, Stone SR (1996)  
Role of the P2 residue in determining the specificity of serpins.  
*Biochemistry* **35**, 11461-11469.
- Doerffel K, Geyer R (1971)  
Analytikum : Methoden der analytischen Chemie und ihre theoretischen Grundlagen.  
VEB Deutscher Verlag für Grundstoffindustrie, Leipzig, 8. Auflage, 409-485.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988)  
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation.  
*Nucleic Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Dubnau D (1991)  
Genetic competence in *Bacillus subtilis*.  
*Microbiol. Rev.* **55**, 395-424.
- Duffy EJ, Anglikar H, Le Bonniec BF, Stone SR (1997)  
Allosteric modulation of the activity of thrombin.  
*Biochem. J.* **321**, 361-365.
- Dugan TA, Yang VW, McQuillan DJ, Hook M (2003)  
Decorin binds fibrinogen in a Zn<sup>2+</sup>-dependent interaction.  
*J. Biol. Chem.* **278**, 13655-13662.
- Edelhoch H (1967)  
Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins.  
*Biochemistry* **6**, 1948-1954.

- Einarsson R, Andersson LO (1977)  
Binding of heparin to human antithrombin III as studied by measurements of tryptophan fluorescence.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **490**, 104-111.
- Engvall E, Perlmann P (1972)  
Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes.  
*J. Immunol.* **109**, 129-135.
- Elmore DT, Smyth JJ (1968)  
A new method for determining the absolute molarity of solutions of trypsin and chymotrypsin by using p-nitrophenyl N2-acetyl-N1-benzylcarbazate.  
*Biochem. J.* **107**, 103-107.
- Farooqui AA (1980)  
Purification of enzymes by heparin-sepharose affinity chromatography.  
*J. Chromatography* **184**, 335-345
- Farr M, Pieper M, Calvete J, Tschesche H (1999)  
The N-terminus of collagenase MMP-8 determines superactivity and inhibition: a relation of structure and function analyzed by biomolecular interaction analysis.  
*Biochemistry* **38**, 7332-7338.
- Filion ML, Bhakta V, Nguyen LH, Liaw PS, Sheffield WP (2004)  
Full or partial substitution of the reactive center loop of alpha-1-proteinase inhibitor by that of heparin cofactor II: P1 Arg is required for maximal thrombin inhibition.  
*Biochemistry* **43**, 14864-14872.
- Fink AL, Calciano LJ, Goto Y, Kurotsu T, Palleros DR (1994)  
Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states.  
*Biochemistry* **33**, 12504-12511.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987)  
Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 7413-7417.
- Foecking MK, Hofstetter H (1986)  
Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors.  
*Gene* **45**, 101-105.
- Foley B, Johnson SA, Hackley B, Smith JC Jr, Halsted JA (1968)  
Zinc content of human platelets.  
*Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **128**, 265-269.
- Fortenberry YM, Whinna HC, Gentry HR, Myles T, Leung LL, Church FC (2004)  
Molecular mapping of the thrombin-heparin cofactor II complex.  
*J. Biol. Chem.* **279**, 43237-43244.
- Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI (1997)  
Evidence for allosteric linkage between exosites 1 and 2 of thrombin.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 25493-25499.
- Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI (2001)  
Conformational changes in thrombin when complexed by serpins.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 44828-44834.

- Fushimi N, Ee CE, Nakajima T, Ichishima E (1999)  
Aspzincin, a family of metalloendopeptidases with a new zinc-binding motif. Identification of new zinc-binding sites (His(128), His(132), and Asp(164)) and three catalytically crucial residues (Glu(129), Asp(143), and Tyr(106)) of deuterolysin from *Aspergillus oryzae* by site-directed mutagenesis.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 24195-24201.
- Futamura A, Stratikos E, Olson ST, Gettins PG (1998)  
Change in environment of the P1 side chain upon progression from the Michaelis complex to the covalent serpin-proteinase complex.  
*Biochemistry* **37**, 13110-13119.
- Gandossi E, Lunven C, Gauffeny C, Roome NO, Berry CN (1998)  
Platelet aggregation induced in vitro by rabbit plasma clot-associated thrombin, and its inhibition by thrombin inhibitors.  
*Thromb. Haemost.* **80**, 840-844.
- Genest M, Ptak M (1982)  
Interactions between Asp, His, Ser residues within models of the active site of serine proteases. A theoretical empirical study.  
*Int. J. Pept. Protein Res.* **19**, 420-431.
- Gersten DM, Marchalonis JJ (1978)  
A rapid, novel method for the solid-phase derivatization of IgG antibodies for immune-affinity chromatography.  
*J. Immunol. Methods* **24**, 305-309.
- Gettins P, Harten B (1988)  
Properties of thrombin- and elastase-modified human antithrombin III.  
*Biochemistry* **27**, 3634-3639.
- Gettins PGW, Patston PA, Olson ST (1996)  
Serpins: structure, function and biology.  
Springer Verlag, Heidelberg.
- Gettins PGW (2002<sup>a</sup>)  
Serpins: Structure, Mechanism, and Function.  
*Chem. Rev.* **102**, 4751-4804.
- Gettins PG (2002<sup>b</sup>)  
The F-helix of serpins plays an essential, active role in the proteinase inhibition mechanism.  
*FEBS Lett.* **523**, 2-6.
- Gietz U, Arvinte T, Häner M, Aebi U, Merkle HP (2000)  
Formulation of sustained release aqueous Zn-hirudin suspensions.  
*Eur. J. Pharm. Sci.* **11**, 33-41.
- Gill SC, von Hippel PH (1989)  
Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data.  
*Anal. Biochem.* **182**, 319-326.
- Gils A, Declercq PJ (1998)  
Structure-function relationships in serpins: current concepts and controversies.  
*Thromb. Haemost.* **80**, 531-541.

- Gomes PB, Dietrich CP (1982)  
Distribution of heparin and other sulfated glycosaminoglycans in vertebrates.  
*Comp. Biochem. Physiol. B* **73**, 857-863.
- Gooptu B, Hazes B, Chang WS, Dafforn TR, Carrell RW, Read RJ, Lomas DA (2000)  
Inactive conformation of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin indicates two-stage insertion of the reactive loop: implications for inhibitory function and conformational disease.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 67-72.
- Goto Y, Takahashi N, Fink AL (1990)  
Mechanism of acid-induced folding of proteins.  
*Biochemistry* **29**, 3480-3488.
- Graham FL, van der Eb AJ (1973)  
Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5.  
*Virology* **54**, 536-539.
- Griffith MJ, Noyes CM, Church FC (1985a)  
Reactive site peptide structural similarity between heparin cofactor II and antithrombin III.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 2218-25.
- Griffith MJ, Noyes CM, Tyndall JA, Church FC (1985b)  
Structural evidence for leucine at the reactive site of heparin cofactor II.  
*Biochemistry* **24**, 6777-6782.
- Grutter MG, Priestle JP, Rahuel J, Grossenbacher H, Bode W, Hofsteenge J, Stone SR (1990)  
Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition.  
*EMBO J.* **9**, 2361-2365.
- Gutheil WG, Bachovchin WW (1993)  
Separation of L-Pro-DL-boroPro into its component diastereomers and kinetic analysis of their inhibition of dipeptidyl peptidase IV. A new method for the analysis of slow, tight-binding inhibition.  
*Biochemistry* **32**, 8723-8731.
- Hall D (2001)  
Use of optical biosensors for the study of mechanistically concerted surface adsorption processes.  
*Anal. Biochem.* **288**, 109-125.
- Hamaguchi K, Geiduschek EP (1962)  
The effect of electrolytes on the stability of deoxyribonucleatehelix.  
*J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1329-1337.
- Hammond GL, Smith CL, Goping IS, Underhill DA, Harley MJ, Reventos J, Musto NA, Gunsalus GL, Bardin CW (1987)  
Primary structure of human corticosteroid binding globulin, deduced from hepatic and pulmonary cDNAs, exhibits homology with serine protease inhibitors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5153-5157.
- Han JH, Van Deerlin VM, Tollefsen DM (1997)  
Heparin facilitates dissociation of complexes between thrombin and a reactive site mutant (L444R) of heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 8243-8249.

- Han JH, Tollefsen DM (1998)  
Ligand binding to thrombin exosite II induces dissociation of the thrombin-heparin cofactor II(L444R) complex.  
*Biochemistry* **37**, 3203-3209.
- Hatton MW, Ross B, Southward SM, Dereske M, Hoogendoorn H, Blajchman MA, Richardson M (1999)  
Uptake of heparin cofactor II and antithrombin into the aorta wall after a deendothelializing injury in vivo: comparison with the behaviors of prothrombin and fibrinogen.  
*J. Lab. Clin. Med.* **133**, 81-87.
- Hayakawa Y, Hayashi T, Hayashi T, Niiya K, Sakuragawa N (1995)  
Selective activation of heparin cofactor II by a sulfated polysaccharide isolated from the leaves of *Artemisia princeps*.  
*Blood Coagul. Fibrinolysis.* **6**, 643-649.
- Hayakawa Y, Hayashi T, Hayashi K, Hayashi T, Ozawa T, Niiya K, Sakuragawa N (1996)  
Heparin cofactor II-dependent antithrombin activity of calcium spirulan.  
*Blood Coagul. Fibrinolysis.* **7**, 554-560.
- Hayakawa Y, Hayashi T, Lee JB, Ozawa T, Sakuragawa N (2000a)  
Activation of heparin cofactor II by calcium spirulan.  
*J. Biol. Chem.* **275**, 11379-11382.
- Hayakawa Y, Hayashi T, Lee J, Srisomporn P, Maeda M, Ozawa T, Sakuragawa N (2000b)  
Inhibition of thrombin by sulfated polysaccharides isolated from green algae.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1543**, 86-94.
- Hayakawa Y, Hirashima Y, Kurimoto M, Hayashi N, Hamada H, Kuwayama N, Endo S (2002)  
Contribution of basic residues of the A helix of heparin cofactor II to heparin- or dermatan sulfate-mediated thrombin inhibition.  
*FEBS Lett.* **522**, 147-150.
- Hayakawa Y, Hirashima Y, Yamamoto H, Kurimoto M, Hayashi T, Lee JB, Endo S (2003)  
Mechanism of activation of heparin cofactor II by calcium spirulan.  
*Arch Biochem Biophys.* **416**, 47-52.
- Hayashi T, Hayakawa Y, Hayashi T, Sasaki H, Sakuragawa N (1997)  
Sulfated polysaccharide from the leaves of *Artemisia Princeps* activates heparin cofactor II independently of the Lys173 and Arg189 residues of heparin cofactor II.  
*Thromb. Res.* **87**, 105-112.
- He L, Vicente CP, Westrick RJ, Eitzman DT, Tollefsen DM (2002)  
Heparin cofactor II inhibits arterial thrombosis after endothelial injury.  
*J. Clin. Invest.* **109**, 213-219
- Helferich F (1961)  
*Nature* **189**, 1001-1002.
- Hemdan RS, Porath J (1985)  
Development of immobilized metal affinity chromatography. III. Interaction of oligopeptides with immobilized nickel iminodiacetate.  
*J. Chrom.* **323**, 265-272.
- Hemdan ES, Zhao YJ, Sulkowski E, Porath J (1989)  
Surface topography of histidine residues: a facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 1811-1815.

- Hernaiz M, Liu J, Rosenberg RD, Linhardt RJ (2000)  
Enzymatic modification of heparan sulfate on a biochip promotes its interaction with antithrombin III.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 292-297.
- Herzog R, Lutz S, Blin N, Marasa JC, Blinder MA, Tollefsen DM (1991)  
Complete nucleotide sequence of the gene for human heparin cofactor II and mapping to chromosomal band 22q11.  
*Biochemistry* **30**, 1350-1357.
- Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Nakai A, Iwamatsu A, Yamada KM, Nagata K (1991)  
HSP47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts.  
*Mol. Cell. Biol.* **11**, 4036-4044.
- Hochuli E, Dobeli H, Schacher A (1987)  
New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues.  
*J. Chromatogr.* **411**, 177-84.
- Hodgson CP, Solaiman F (1996)  
Virosomes: cationic liposomes enhance retroviral transduction.  
*Nat. Biotechnol.* **14**, 339-342.
- Hoffman M, Pratt CW, Brown RL, Church FC (1989)  
Heparin cofactor II-proteinase reaction products exhibit neutrophil chemoattractant activity.  
*Blood* **73**, 1682-1685.
- Hofsteenge J, Braun PJ, Stone SR (1988)  
Enzymatic properties of proteolytic derivatives of human alpha-thrombin.  
*Biochemistry* **27**, 2144-2151.
- Hogg PJ, Jackson CM (1989)  
Fibrin monomer protects thrombin from inactivation by heparin-antithrombin III: implications for heparin efficacy.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 3619-3623.
- Hoke DE, LaBrenz SR, Hook M, Carson DD (2000)  
Multiple domains contribute to heparin/heparan sulfate binding by human HIP/L29.  
*Biochemistry* **39**, 15686-15694.
- Hölper J (1991)  
Entwicklung und Automatisierung eines ELISA zum quantitativen Nachweis von Heparin Cofaktor II in Körperflüssigkeiten.  
Diplomarbeit, Hoechst AG, Fachhochschule Giessen-Friedberg.
- Holland CA, Henry AT, Whinna HC, Church FC (2000)  
Effect of oligodeoxynucleotide thrombin aptamer on thrombin inhibition by heparin cofactor II and antithrombin.  
*FEBS Lett.* **484**, 87-91.
- Hopkins PC, Carrell RW, Stone SR (1993)  
Effects of mutations in the hinge region of serpins.  
*Biochemistry* **32**, 7650-7657.
- Hopkins PC, Stone SR (1995)  
The contribution of the conserved hinge region residues of alpha1-antitrypsin to its reaction with elastase.  
*Biochemistry* **34**, 15872-15879.

- Hopkins PC, Chang WS, Wardell MR, Stone SR (1997)  
Inhibitory mechanism of serpins. Mobility of the C-terminal region of the reactive-site loop.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 3905-3909.
- Hopp TP, Woods KR (1981)  
Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 3824-3828.
- Horne MK 3rd, Merryman PK, Cullinane AM (2001)  
Histidine-proline-rich glycoprotein binding to platelets mediated by transition metals.  
*Thromb. Haemost.* **85**, 890-895.
- Hortin G, Tollefsen DM, Strauss AW (1986)  
Identification of two sites of sulfation of human heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 15827-15830.
- Hortin GL, Tollefsen DM, Benutto BM (1989)  
Antithrombin activity of a peptide corresponding to residues 54-75 of heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 13979-13982.
- Hotchkiss KA, Chesterman CN, Hogg PJ (1994)  
Inhibition of heparin activity in plasma by soluble fibrin: evidence for ternary thrombin-fibrin-heparin complex formation.  
*Blood* **84**, 498-503.
- Hubbard SC, Walls L, Ruley HE, Muchmore EA (1994)  
Generation of Chinese hamster ovary cell glycosylation mutants by retroviral insertional mutagenesis. Integration into a discrete locus generates mutants expressing high levels of N-glycolylneuraminic acid.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 3717-3724.
- Huber R, Carrell RW (1989)  
Implications of the three-dimensional structure of alpha 1-antitrypsin for structure and function of serpins.  
*Biochemistry* **28**, 8951-8966.
- Hunt LT, Dayhoff MO (1980)  
A surprising new protein superfamily containing ovalbumin, antithrombin-III, and alpha 1-proteinase inhibitor.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**, 864-871.
- Huntington JA, McCoy A, Belzar KJ, Pei XY, Gettins PG, Carrell RW (2000<sup>a</sup>)  
The conformational activation of antithrombin. A 2.85-Å structure of a fluorescein derivative reveals an electrostatic link between the hinge and heparin binding regions.  
*J. Biol. Chem.* **275**, 15377-15383.
- Huntington JA, Read RJ, Carrell RW (2000<sup>b</sup>)  
Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation.  
*Nature* **407**, 923-926.
- Huntington JA (2003)  
Mechanisms of glycosaminoglycan activation of the serpins in hemostasis.  
*J. Thromb. Haemost.* **1**, 1535-1549.
- Hurst RE, Poon MC, Griffith MJ (1983)  
Structure-activity relationships of heparin. Independence of heparin charge density and antithrombin-binding domains in thrombin inhibition by antithrombin and heparin cofactor II.  
*J. Clin. Invest.* **72**, 1042-1045.

- Ingham KC (1990)  
Precipitation of proteins with polyethylene glycol.  
Methods Enzymol. **182**, 301-306.
- Inhorn RC, Tollefsen DM (1986)  
Isolation and characterization of a partial cDNA clone for heparin cofactor III.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **137**, 431-436.
- Invitrogen (2003)  
Novex Pre-Cast Gel Elektrophoresis Guide.  
Invitrogen GmbH, Karlsruhe.
- Iozzo RV (1998)  
Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function.  
Annu. Rev. Biochem. **67**, 609-52.
- Irving JA, Pike RN, Lesk AM, Whisstock JC (2000)  
Phylogeny of the serpin superfamily: implications of patterns of amino acid conservation for structure and function.  
Genome Res. **10**, 1845-1864.
- Irving JA, Steenbakkers PJ, Lesk AM, Op den Camp HJ, Pike RN, Whisstock JC (2002)  
Serpins in prokaryotes.  
Mol. Biol. Evol. **19**, 1881-1890.
- Isawa H, Yuda M, Orito Y, Chinzei Y (2002)  
A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen.  
J. Biol. Chem. **277**, 27651-27658.
- Izaguirre G, Zhang W, Swanson R, Bedsted T, Olson ST (2003)  
Localization of an antithrombin exosite that promotes rapid inhibition of factors Xa and IXa dependent on heparin activation of the serpin.  
J. Biol. Chem. **278**, 51433-51440.
- James EL, Whisstock JC, Gore MG, Bottomley SP (1999)  
Probing the unfolding pathway of alpha1-antitrypsin.  
J. Biol. Chem. **274**, 9482-9488.
- Janciauskiene S (2001)  
Conformational properties of serine proteinase inhibitors (serpins) confer multiple pathophysiological roles.  
Biochim. Biophys. Acta. **1535**, 221-235.
- Jeter ML, Ly LV, Fortenberry YM, Whinna HC, White RR, Rusconi CP, Sullenger BA, Church FC (2004)  
RNA aptamer to thrombin binds anion-binding exosite-2 and alters protease inhibition by heparin-binding serpins.  
FEBS Lett. **568**, 10-14.
- Jin L, Abrahams JP, Skinner R, Petitou M, Pike RN, Carrell RW (1997)  
The anticoagulant activation of antithrombin by heparin.  
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **94**, 14683-14688.
- Johnson D, Travis J (1977)  
Inactivation of human alpha 1-proteinase inhibitor by thiol proteinases.  
Biochem. J. **163**, 639-641.

- Johnsson B, Lofas S, Lindquist G (1991)  
Immobilization of proteins to a carboxymethyl-dextran-modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface plasmon resonance sensors.  
*Anal. Biochem.* **198**, 268-277.
- Kao FT, Puck TT (1967)  
Genetics of somatic mammalian cells. IV. Properties of Chinese hamster cell mutants with respect to the requirement for proline.  
*Genetics* **55**, 513-524.
- Kamp PB, Ragg H (1999)  
Rapid changes in the exon/intron structure of a mammalian thrombin inhibitor gene.  
*Gene* **229**, 137-144.
- Kamp P, Strathmann A, Ragg H (2001)  
Heparin cofactor II, antithrombin-beta and their complexes with thrombin in human tissues.  
*Thromb. Res.* **101**, 483-491.
- Karlsson R, Michaelsson A, Mattsson L (1991)  
Kinetic analysis of monoclonal antibody-antigen interactions with a new biosensor based analytical system.  
*J. Immunol. Methods* **145**, 229-240.
- Karlsson GB, Platt FM (1991)  
Analysis and isolation of human transferrin receptor using the OKT-9 monoclonal antibody covalently crosslinked to magnetic beads.  
*Anal. Biochem.* **199**, 219-222.
- Kaslik G, Kardos J, Szabo E, Szilagy L, Zavodszky P, Westler WM, Markley JL, Graf L (1997)  
Effects of serpin binding on the target proteinase: global stabilization, localized increased structural flexibility, and conserved hydrogen bonding at the active site.  
*Biochemistry* **36**, 5455-5464.
- Kasza A, Petersen HH, Heegaard CW, Oka K, Christensen A, Dubin A, Chan L, Andreasen PA (1997)  
Specificity of serine proteinase/serpin complex binding to very-low-density lipoprotein receptor and alpha2-macroglobulin receptor/low-density-lipoprotein-receptor-related protein.  
*Eur. J. Biochem.* **248**, 270-281.
- Kaufman RJ, Sharp PA (1982)  
Amplification and expression of sequences cotransfected with a modular dihydrofolate reductase complementary DNA gene.  
*J. Mol. Biol.* **159**, 601-621
- Kett WC, Osmond RI, Moe L, Skett SE, Kinnear BF, Coombe DR (2003)  
Avidin is a heparin-binding protein. Affinity, specificity and structural analysis.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1620**, 225-234.
- Khanna NC, Tokuda M, Waisman DM (1986)  
Conformational changes induced by binding of divalent cations to calregulin.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 8883-8887.
- Kim S, Woo J, Seo EJ, Yu M, Ryu S (2001)  
A 2.1 Å resolution structure of an uncleaved alpha(1)-antitrypsin shows variability of the reactive center and other loops.  
*J. Mol. Biol.* **306**, 109-119.

- Kjellen, L.; Lindahl, U. (1991)  
Proteoglycans: structures and interactions.  
*Annu. Rev. Biochem.* **60**, 443-475.
- Klauser RJ (1991)  
Interaction of the sulfated lactobionic acid amide LW 10082 with thrombin and its endogenous inhibitors.  
*Thromb. Res.* **62**, 557-565.
- Kluszynski BA, Kim C, Faulk WP (1997)  
Zinc as a cofactor for heparin neutralization by histidine-rich glycoprotein.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 13541-13547.
- Knight CG (1995)  
Active-site titration of peptidases.  
*Methods Enzymol.* **248**, 85-101.
- Komiyama T, Ray CA, Pickup DJ, Howard AD, Thornberry NA, Peterson EP, Salvesen G (1994)  
Inhibition of interleukin-1 beta converting enzyme by the cowpox virus serpin CrmA. An example of cross-class inhibition.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 19331-19337.
- Komyod W (2001)  
Experimente zur Fraktionierung von Glykosaminoglykanen durch Chromatographie an einer Heparinkofaktor II-Affinitätsmatrix.  
Diplomarbeit, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Kooyman RPH, Kolkman H, Van Gent J, Greve J (1988)  
Surface plasmon resonance immunosensors: sensitivity considerations.  
*Analytica Chimica Acta* **213**, 35-45.
- Kounnas MZ, Chappell DA, Wong H, Argraves WS, Strickland DK (1995)  
The cellular internalization and degradation of hepatic lipase is mediated by low density lipoprotein receptor-related protein and requires cell surface proteoglycans.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 9307-9312.
- Kounnas MZ, Church FC, Argraves WS, Strickland DK (1996)  
Cellular internalization and degradation of antithrombin III-thrombin, heparin cofactor II-thrombin, and alpha 1-antitrypsin-trypsin complexes is mediated by the low density lipoprotein receptor-related protein.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 6523-6529.
- Kozulic, B (1995)  
Models for gel electrophoresis.  
*Anal. Biochem.* **231**, 1-12.
- Krüger O (2003)  
Eine phylogenetische Analyse von Serpin-Genen aus eukaryotischen Genomprojekten.  
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Kuzmic P, Sideris S, Cregar LM, Elrod KC, Rice KD, Janc JW (2000)  
High-throughput screening of enzyme inhibitors: automatic determination of tight-binding inhibition constants.  
*Anal. Biochem.* **281**, 62-67.
- Lakowicz JR (1992)  
Topics in Fluorescence Spectroscopy, volume 3: Biochemical Applications.  
Plenum Press, New York.

- Lane DA, Denton J, Flynn AM, Thunberg L, Lindahl U (1984)  
Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4.  
*Biochem. J.* **218**, 725-732.
- Lawrence DA, Ginsburg D, Day DE, Berkenpas MB, Verhamme IM, Kvassman JO, Shore JD (1995)  
Serpin-protease complexes are trapped as stable acyl-enzyme intermediates.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 25309-25312.
- Lawrence DA, Olson ST, Muhammad S, Day DE, Kvassman JO, Ginsburg D, Shore JD (2000)  
Partitioning of serpin-proteinase reactions between stable inhibition and substrate cleavage is regulated by the rate of serpin reactive center loop insertion into beta-sheet A.  
*J. Biol. Chem.* **275**, 5839-5844.
- Li W, Johnson DJ, Esmon CT, Huntington JA (2004)  
Structure of the antithrombin-thrombin-heparin ternary complex reveals the antithrombotic mechanism of heparin.  
*Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 857-862.
- Liaw PC, Austin RC, Fredenburgh JC, Stafford AR, Weitz JI (1999)  
Comparison of heparin- and dermatan sulfate-mediated catalysis of thrombin inactivation by heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 27597-27604.
- Liaw PC, Becker DL, Stafford AR, Fredenburgh JC, Weitz JI (2001)  
Molecular basis for the susceptibility of fibrin-bound thrombin to inactivation by heparin cofactor ii in the presence of dermatan sulfate but not heparin.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 20959-20965.
- Lin Y, Pixley RA, Colman RW (2000)  
Kinetic analysis of the role of zinc in the interaction of domain 5 of high-molecular weight kininogen (HK) with heparin.  
*Biochemistry* **39**, 5104-5110.
- Lindahl U, Backstrom G, Thunberg L, Leder IG (1980)  
Evidence for a 3-O-sulfated D-glucosamine residue in the antithrombin-binding sequence of heparin.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 6551-6555.
- Lindl T, Bauer J (1994)  
Zell- und Gewebekultur.  
Gustav Fischer Verlag, 3. Aufl., Stuttgart.
- Littlefield JW (1964)  
Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants.  
*Science* **145**, 709-710.
- Liu LW, Ye J, Johnson AE, Esmon CT (1991)  
Proteolytic formation of either of the two prothrombin activation intermediates results in formation of a hirugen-binding site.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 23633-23636.
- Liu J, Laue TM, Choi HU, Tang LH, Rosenberg L (1994)  
The self-association of biglycan from bovine articular cartilage.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 28366-28373.

- Liu L, Dewar L, Song Y, Kulczycky M, Blajchman MA, Fenton JW 2nd, Andrew M, Delorme M, Ginsberg J, Preissner KT, et al. (1995)  
Inhibition of thrombin by antithrombin III and heparin cofactor II in vivo.  
*Thromb. Haemost.* **73**, 405-412.
- Longas MO, Ferguson WS, Finlay TH (1980)  
A disulfide bond in antithrombin is required for heparin-accelerated thrombin inactivation.  
*J. Biol. Chem.* **255**, 3436-3441.
- Lottspeich F, Zorbas H (1998)  
Bioanalytik.  
Spektrum Akademischer Verlag, 1. Aufl., Heidelberg.
- Lu C, Shimaoka M, Ferzly M, Oxvig C, Takagi J, Springer TA (2001)  
An isolated, surface-expressed I domain of the integrin  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$  is sufficient for strong adhesive function when locked in the open conformation with a disulfide bond.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 2387-2392.
- MacGregor GR, Caskey CT (1989)  
Construction of plasmids that express E. coli beta-galactosidase in mammalian cells.  
*Nucleic Acids Res.* **17**, 2365.
- Mach H, Volkin DB, Burke CJ, Middaugh CR, Linhardt RJ, Fromm JR, Loganathan D, Mattsson L (1993)  
Nature of the interaction of heparin with acidic fibroblast growth factor.  
*Biochemistry* **32**, 5480-5489.
- Maimone MM, Tollefsen DM (1988)  
Activation of heparin cofactor II by heparin oligosaccharides.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**, 1056-1061.
- Maimone MM, Tollefsen DM (1990)  
Structure of a dermatan sulfate hexasaccharide that binds to heparin cofactor II with high affinity.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 18263-18271.
- Malmqvist M (1993)  
Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.  
*Curr. Opin. Immunol.* **5**, 282-286.
- Maniatis T, Jeffrey A, van deSande H (1975)  
Chain length determination of small double- and single-stranded DNA molecules by polyacrylamide gel electrophoresis.  
*Biochemistry* **14**, 3787-3794.
- Markwardt F (1994)  
The development of hirudin as an antithrombotic drug.  
*Thromb. Res.* **74**, 1-23.
- Martinez del Pozo A, Gasset M, Onaderra M, Gavilanes JG (1989)  
Effect of divalent cations on structure-function relationships of the antitumor protein alpha-sarcin.  
*Int. J. Pept. Protein Res.* **34**, 416-422.
- Marx G, Korner G, Mou X, Gorodetsky R (1993)  
Packaging zinc, fibrinogen, and factor XIII in platelet alpha-granules.  
*J. Cell. Physiol.* **156**, 437-442.

- Mascellani G, Liverani L, Bianchini P, Parma B, Torri G, Bisio A, Guerrini M, Casu B (1993)  
Structure and contribution to the heparin cofactor II-mediated inhibition of thrombin of naturally oversulphated sequences of dermatan sulphate.  
*Biochem. J.* **296**, 639-648.
- Matsumura M, Matthews BW (1991)  
Stabilization of functional proteins by introduction of multiple disulfide bonds.  
*Methods Enzymol.* **202**, 336-356.
- McDonell MW, Simon MN, Studier FW (1977)  
Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels.  
*J. Mol. Biol.* **110**, 119-146.
- Meagher JL, Olson ST, Gettins PG (2000)  
Critical role of the linker region between helix D and strand 2A in heparin activation of antithrombin.  
*J. Biol. Chem.* **275**, 2698-2704.
- Meloni FJ, Schmaier AH (1991)  
Low molecular weight kininogen binds to platelets to modulate thrombin-induced platelet activation.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 6786-6794.
- Mikhailenko I, Kounnas MZ, Strickland DK (1995)  
Low density lipoprotein receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor mediates the cellular internalization and degradation of thrombospondin. A process facilitated by cell-surface proteoglycans.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 9543-9549.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982)  
Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.  
*EMBO J.* **1**, 841-845.
- Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM (1999)  
Aminoglycosides: activity and resistance.  
*Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 727-737.
- Mitchell JW, Church FC (2002)  
Aspartic acid residues 72 and 75 and tyrosine-sulfate 73 of heparin cofactor II promote intramolecular interactions during glycosaminoglycan binding and thrombin inhibition.  
*J. Biol. Chem.* **277**, 19823-19830.
- Mizuarai S, Ono K, You J, Kamihira M, Iijima S (2001)  
Protamine-Modified DDAB Lipid Vesicles Promote Gene Transfer in the Presence of Serum.  
*J. Biochem.* **129**, 125-132.
- Morii M, Travis J (1983)  
Amino acid sequence at the reactive site of human alpha 1-antichymotrypsin.  
*J. Biol. Chem.* **258**, 12749-12752.
- Morrison JF (1969)  
Kinetics of the reversible inhibition of enzyme-catalysed reactions by tight-binding inhibitors.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **185**, 269-286.
- Multhaup G, Bush AI, Pollwein P, Masters CL (1994)  
Interaction between the zinc (II) and the heparin binding site of the Alzheimer's disease beta A4 amyloid precursor protein (APP).  
*FEBS Lett.* **355**, 151-154.

- Murphy DJ (2004)  
Determination of accurate KI values for tight-binding enzyme inhibitors: an in silico study of experimental error and assay design.  
*Anal. Biochem.* **327**, 61-67.
- Myles T, Church FC, Whinna HC, Monard D, Stone SR (1998)  
Role of thrombin anion-binding exosite-I in the formation of thrombin-serpin complexes.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 31203-31208.
- Nagase H, Woessner JF (1999)  
Matrix metalloproteinases.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494.
- Nakheleh R, Vogt JM, Edson JR (1988)  
Heparin Cofactor II Assay. Elimination of Heparin and Antithrombin-III Effects.  
*Am. J. Clin. Path.* **89**, 353- 358.
- Ngo TT (1991)  
Immunoassay.  
*Curr. Opin. Biotechnol.* **2**, 102-109.
- Nieba L, Krebber A, Pluckthun A (1996)  
Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics.  
*Anal. Biochem.* **234**, 155-165.
- Nordenman B, Björk I (1978)  
Binding of low-affinity and high-affinity heparin to antithrombin. Ultraviolet difference spectroscopy and circular dichroism studies.  
*Biochemistry* **17**, 3339-3344.
- Nordenman B, Danielsson A, Bjork I (1978)  
The binding of low-affinity and high-affinity heparin to antithrombin. Fluorescence studies.  
*Eur. J. Biochem.* **90**, 1-6.
- O'Keefe D, Olson ST, Gasiunas N, Gallagher J, Baglin TP, Huntington JA (2004)  
The heparin binding properties of heparin cofactor II suggest an antithrombin-like activation mechanism.  
*J. Biol. Chem.* **279**, 50267-50273.
- Olson ST, Shore JD (1981)  
Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Characterization of the protein fluorescence enhancement.  
*J. Biol. Chem.* **256**, 11065-11072.
- Olson ST, Srinivasan KR, Bjork I, Shore JD (1981)  
Binding of high affinity heparin to antithrombin III. Stopped flow kinetic studies of the binding interaction.  
*J. Biol. Chem.* **256**, 11073-11079.
- Olson ST (1985)  
Heparin and ionic strength-dependent conversion of antithrombin III from an inhibitor to a substrate of alpha-thrombin.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 10153-10160.

- Olson ST, Bjork I (1991)  
Predominant contribution of surface approximation to the mechanism of heparin acceleration of the antithrombin-thrombin reaction. Elucidation from salt concentration effects.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 6353-6364.
- Olson ST, Halvorson HR, Bjork I (1991)  
Quantitative characterization of the thrombin-heparin interaction. Discrimination between specific and nonspecific binding models.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 6342-6352.
- Olson ST, Bjork I, Sheffer R, Craig PA, Shore JD, Choay J (1992)  
Role of the antithrombin-binding pentasaccharide in heparin acceleration of antithrombin-proteinase reactions. Resolution of the antithrombin conformational change contribution to heparin rate enhancement.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 12528-12538.
- Olson ST, Bock PE, Kvassman J, Shore JD, Lawrence DA, Ginsburg D, Bjork I (1995)  
Role of the catalytic serine in the interactions of serine proteinases with protein inhibitors of the serpin family. Contribution of a covalent interaction to the binding energy of serpin-proteinase complexes.  
*J. Biol. Chem.* **270**, 30007-30017.
- Oscarsson LG, Pejler G, Lindahl U (1989)  
Location of the antithrombin-binding sequence in the heparin chain.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 296-304.
- Osmond RI, Kett WC, Skett SE, Coombe DR (2002)  
Protein-heparin interactions measured by BIAcore 2000 are affected by the method of heparin immobilization.  
*Anal. Biochem.* **310**, 199-207.
- Pace CN, Vajdos F, Fee L, Grimsley G, Gray T (1995)  
How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein.  
*Protein Sci.* **4**, 2411-2423.
- Pagano JS, Vaheri A (1965)  
Enhancement of infectivity of poliovirus RNA with diethylaminoethyl-dextran (DEAE-D).  
*Arch. Gesamte. Virusforsch.* **17**, 456-464.
- Page MJ, Sydenham MA (1991)  
High level expression of the humanized monoclonal antibody Campath-1H in CHO cells.  
*Biotechnology* **9**, 64-68.
- Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS (2002)  
Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans.  
*Biochem. J.* **368**, 81-90.
- Pantoliano MW, Ladner RC, Bryan PN, Rollence ML, Wood JF, Poulos TL (1987)  
Protein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond.  
*Biochemistry* **26**, 2077-2082.
- Pari GS, St Jeor SC (1990)  
Effect of human cytomegalovirus on replication of SV40 origin and the expression of T antigen.  
*Virology* **177**, 824-828.

- Parisi AF, Vallee BL (1970)  
Isolation of a zinc alpha-2-macroglobulin from human serum.  
*Biochemistry* **9**, 2421-2426.
- Parker KA, Tollefsen DM (1985)  
The protease specificity of heparin cofactor II. Inhibition of thrombin generated during coagulation.  
*J. Biol. Chem.* **260**, 3501-3505.
- Parrish RF, Fair WR (1981)  
Selective binding of zinc ions to heparin rather than to other glycosaminoglycans.  
*Biochem. J.* **193**, 407-410.
- Patston PA, Gettins P, Beechem J, Schapira M (1991)  
Mechanism of serpin action: evidence that C1 inhibitor functions as a suicide substrate.  
*Biochemistry* **30**, 8876-8882.
- Pavao MS, Aiello KR, Werneck CC, Silva LC, Valente AP, Mulloy B, Colwell NS, Tollefsen DM, Mourao PA (1998)  
Highly sulfated dermatan sulfates from Ascidians. Structure versus anticoagulant activity of these glycosaminoglycans.  
*J. Biol. Chem.* **273**, 27848-27857.
- Perez-Howard GM, Weil PA, Beechem JM (1995)  
Yeast TATA binding protein interaction with DNA: fluorescence determination of oligomeric state, equilibrium binding, on-rate, and dissociation kinetics.  
*Biochemistry* **34**, 8005-8017.
- Permyakov SE, Oberg KA, Cherskaya AM, Shavlovsky MM, Permyakov EA, Uversky VN (2002)  
Human alpha-fetoprotein as a Zn(2+)-binding protein. Tight cation binding is not accompanied by global changes in protein structure and stability.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1586**, 1-10.
- Peterson FC, Gettins PG (2001)  
Insight into the mechanism of serpin-proteinase inhibition from 2D [<sup>1</sup>H-<sup>15</sup>N] NMR studies of the 69 kDa alpha 1-proteinase inhibitor Pittsburgh-trypsin covalent complex.  
*Biochemistry* **40**, 6284-6292.
- Petitou M, Lormeau JC, Perly B, Berthault P, Bossennec V, Sie P, Choay J (1988)  
Is there a unique sequence in heparin for interaction with heparin cofactor II? Structural and biological studies of heparin-derived oligosaccharides.  
*J. Biol. Chem.* **263**, 8685-8690.
- Pierce (2001)  
Antibody Binding and Elution Buffer Instruction Book.  
Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn.
- Pike RN, Potempa J, Skinner R, Fitton HL, McGraw WT, Travis J, Owen M, Jin L, Carrell RW (1997)  
Heparin-dependent modification of the reactive center arginine of antithrombin and consequent increase in heparin binding affinity.  
*J. Biol. Chem.* **272**, 19652-19655.
- Plessow R (2003)  
Entwicklung und Charakterisierung einer Methode zur Untersuchung von Makromolekülen mit Hilfe zeitaufgelöster laserinduzierter Fluoreszenz und Anregungs-Emissionsspektroskopie.  
Dissertation, Fakultät für Chemie, Universität Bielefeld.

- Plotnick MI, Mayne L, Schechter NM, Rubin H (1996)  
Distortion of the active site of chymotrypsin complexed with a serpin.  
*Biochemistry* **35**, 7586-7590.
- Plotnick MI, Schechter NM, Wang ZM, Liu X, Rubin H (1997)  
Role of the P6-P3' region of the serpin reactive loop in the formation and breakdown of the inhibitory complex.  
*Biochemistry* **36**, 14601-14608.
- Plotnick MI, Samakur M, Wang ZM, Liu X, Rubin H, Schechter NM, Selwood T (2002a)  
Heterogeneity in serpin-protease complexes as demonstrated by differences in the mechanism of complex breakdown.  
*Biochemistry* **41**, 334-342.
- Plotnick MI, Rubin H, Schechter NM (2002b)  
The effects of reactive site location on the inhibitory properties of the serpin alpha(1)-antichymotrypsin.  
*J. Biol. Chem.* **277**, 29927-29935.
- Porath J, Carlsson J, Olsson I, Belfrage G (1975)  
Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation.  
*Nature* **258**, 598-599.
- Porath J (1992)  
Immobilized metal ion affinity chromatography.  
*Protein Expr. Purif.* **3**, 263-281.
- Pratt CW, Whinna HC, Meade JB, Treanor RE, Church FC (1989)  
Physicochemical aspects of heparin cofactor II.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* **556**, 104-115.
- Pratt CW, Tobin RB, Church FC (1990)  
Interaction of heparin cofactor II with neutrophil elastase and cathepsin G.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 6092-6097.
- Pratt CW, Whinna HC, Church FC (1992)  
A comparison of three heparin-binding serine proteinase inhibitors.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 8795-8801.
- Pratt CW, Church FC (1993)  
General features of the heparin-binding serpins antithrombin, heparin cofactor II and protein C inhibitor.  
*Blood Coagul. Fibrinolysis.* **4**, 479-490.
- Puck TT (1958)  
Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects.  
*J. Exp. Med.* **108**, 945-956.
- QIAGEN (2002)  
QIAquick Spin Handbook.  
QIAGEN GmbH, Hilden.
- QIAGEN (2003)  
Plasmid Purification Handbook.  
QIAGEN GmbH, Hilden.

- Ragg H (1986)  
A new member of the plasma protease inhibitor gene family.  
*Nucleic Acids Res.* **14**, 1073-1088.
- Ragg H, Preibisch G (1988)  
Structure and expression of the gene coding for the human serpin hLS2.  
*J. Biol. Chem.* **263**, 12129-12134.
- Ragg H, Ulshofer T, Gerewitz J (1990a)  
On the activation of human leuserpin-2, a thrombin inhibitor, by glycosaminoglycans.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 5211-5218.
- Ragg H, Ulshofer T, Gerewitz J (1990b)  
Glycosaminoglycan-mediated leuserpin-2/thrombin interaction. Structure-function relationships.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 22386-22391.
- Ragg H, Lokot T, Kamp PB, Atchley WR, Dress A (2001)  
Vertebrate serpins: construction of a conflict-free phylogeny by combining exon-intron and diagnostic site analyses.  
*Mol. Biol. Evol.* **18**, 577-584.
- Reeves HC, Heeren R, Malloy P (1981)  
Enzyme purification using antibody crosslinked to protein A agarose: application to *Escherichia coli* NADP-isocitrate dehydrogenase.  
*Anal. Biochem.* **115**, 194-196.
- Renne T, Dedio J, David G, Muller-Esterl W (2000)  
High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells.  
*J. Biol. Chem.* **275**, 33688-33696.
- Ricard-Blum S, Feraud O, Lortat-Jacob H, Rencurosi A, Fukai N, Dkhissi F, Vittet D, Imberty A, Olsen BR, van der Rest M (2004)  
Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations.  
*J. Biol. Chem.* **279**, 2927-2936.
- Rich RL, Myszka DG (2000)  
Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis.  
*Curr. Opin. Biotechnol.* **11**, 54-61.
- Ringold G, Dieckman B, Lee F (1981)  
Coexpression and amplification of dihydrofolate reductase cDNA and the *Escherichia coli* XGPRT gene in chinese hamster ovary cells.  
*J. Mol. Appl. Genet.* **1**, 165-175
- Rippe K (1997)  
Analysis of protein-DNA binding at equilibrium.  
*B. I. F. Futura* **12**, 20-26
- Rogers SJ, Pratt CW, Whinna HC, Church FC (1992)  
Role of thrombin exosites in inhibition by heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 3613-3617.

- Røjkjær R, Schousboe I (1997)  
The surface-dependent autoactivation mechanism of factor XII.  
*Eur. J. Biochem.* **243**, 160-166.
- Rothenhäusler B, Knoll W (1988)  
Surface-plasmon microscopy  
*Nature* **332**, 615-617.
- Rubin H, Wang ZM, Nickbarg EB, McLarney S, Naidoo N, Schoenberger OL, Johnson JL, Cooperman BS (1990)  
Cloning, expression, purification, and biological activity of recombinant native and variant human alpha 1-antichymotrypsins.  
*J. Biol. Chem.* **265**, 1199-1207.
- Rydel TJ, Ravichandran KG, Tulinsky A, Bode W, Huber R, Roitsch C, Fenton JW 2nd (1990)  
The structure of a complex of recombinant hirudin and human alpha-thrombin.  
*Science* **249**, 277-280.
- Sambrook J, Frisch EF, Maniatis T (1989)  
Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Edition.  
Verlag Cold Spring Harbor Laboratory Press Plainview, New York.
- Sandstrom J, Carlsson L, Marklund SL, Edlund T (1992)  
The heparin-binding domain of extracellular superoxide dismutase C and formation of variants with reduced heparin affinity.  
*J. Biol. Chem.* **267**, 18205-18209.
- Sarafanov AG, Ananyeva NM, Shima M, Saenko EL (2001)  
Cell surface heparan sulfate proteoglycans participate in factor VIII catabolism mediated by low density lipoprotein receptor-related protein.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 11970-11979.
- Schägger H, Aquila H, Von Jagow G (1988)  
Coomassie blue-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for direct visualization of polypeptides during electrophoresis.  
*Anal. Biochem.* **173**, 201-205.
- Schechter I, Berger A (1967)  
On the size of the active site in proteases. I. Papain.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
- Schechter NM, Sprows JL, Schoenberger OL, Lazarus GS, Cooperman BS, Rubin H (1989)  
Reaction of human skin chymotrypsin-like proteinase chymase with plasma proteinase inhibitors.  
*J. Biol. Chem.* **264**, 21308-21315.
- Schechter NM, Jordan LM, James AM, Cooperman BS, Wang ZM, Rubin H (1993)  
Reaction of human chymase with reactive site variants of alpha 1-antichymotrypsin. Modulation of inhibitor versus substrate properties.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 23626-23633.
- Schechter NM, Plotnick MI (2004)  
Measurement of the kinetic parameters mediating protease-serpin inhibition.  
*Methods.* **32**, 159-168.

- Schimke, R.T. (1988)  
Gene amplification in cultured cells.  
*J. Biol. Chem.* **263**, 5989-5992.
- Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U, Greaves MF (1982)  
A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix.  
*J. Biol. Chem.* **257**, 10766-10769.
- Schousboe I (2001)  
Rapid and cooperative binding of factor XII to human umbilical vein endothelial cells.  
*Eur. J. Biochem.* **268**, 3958-3963.
- Schreuder HA, de Boer B, Dijkema R, Mulders J, Theunissen HJ, Grootenhuys PD, Hol WG (1994)  
The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions.  
*Nat. Struct. Biol.* **1**, 48-54.
- Scully MF, Ellis V, Seno N, Kakkar VV (1988)  
Effect of oversulphated chondroitin and dermatan sulphate upon thrombin and factor Xa inactivation by antithrombin III or heparin cofactor II.  
*Biochem. J.* **254**, 547-551.
- Seed, B. (1987)  
An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2.  
*Nature* **329**, 840-842.
- Sharp PA, Sugden B, Sambrook J (1973)  
Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis.  
*Biochemistry* **12**, 3055-3063.
- Sheehan JP, Wu Q, Tollefsen DM, Sadler JE (1993)  
Mutagenesis of thrombin selectively modulates inhibition by serpins heparin cofactor II and antithrombin III. Interaction with the anion-binding exosite determines heparin cofactor II specificity.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 3639-3645.
- Sheehan JP, Tollefsen DM, Sadler JE (1994)  
Heparin cofactor II is regulated allosterically and not primarily by template effects. Studies with mutant thrombins and glycosaminoglycans.  
*J. Biol. Chem.* **269**, 32747-32751.
- Sheffield WP, Schuyler PD, Blajchman MA (1994)  
Molecular cloning and expression of rabbit heparin cofactor II: a plasma thrombin inhibitor highly conserved between species.  
*Thromb. Haemost.* **71**, 778-782.
- Sheffield WP, Blajchman MA (1995)  
Deletion mutagenesis of heparin cofactor II: defining the minimum size of a thrombin inhibiting serpin.  
*FEBS Lett.* **365**, 189-192.
- Shirk RA, Church FC, Wagner WD (1996)  
Arterial smooth muscle cell heparan sulfate proteoglycans accelerate thrombin inhibition by heparin cofactor II.  
*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1138-1146.

- Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD, Church FC, Wagner WD (2000)  
Altered dermatan sulfate structure and reduced heparin cofactor II-stimulating activity of biglycan and decorin from human atherosclerotic plaque.  
*J. Biol. Chem.* **275**, 18085-18092.
- Shore JD, Olson ST, Craig PA, Choay J, Bjork (1989)  
Kinetics of heparin action.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* **556**, 75-80.
- Sié P, Dupouy D, Pichon J, Boneu B (1985)  
Turnover study of heparin cofactor II in healthy man.  
*Thromb. Haemost.* **54**, 635-638.
- Sié P, Petitou M, Lormeau JC, Dupouy D, Boneu B, Choay J (1988)  
Studies on the structural requirements of heparin for the catalysis of thrombin inhibition by heparin cofactor II.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **966**, 188-195.
- Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, Gettins PG, Irving JA, Lomas DA, Luke CJ, Moyer RW, Pemberton PA, Remold-O'Donnell E, Salvesen GS, Travis J, Whisstock JC (2001)  
The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 33293-33296.
- Skinner R, Abrahams JP, Whisstock JC, Lesk AM, Carrell RW, Wardell MR (1997)  
The 2.6 Å structure of antithrombin indicates a conformational change at the heparin binding site.  
*J. Mol. Biol.* **266**, 601-609.
- Solodin I, Brown CS, Bruno MS, Chow CY, Jang EH, Debs RJ, Heath TD (1995)  
A novel series of amphiphilic imidazolium compounds for in vitro and in vivo gene delivery.  
*Biochemistry* **34**, 13537-13544.
- Stein PE, Carrell RW (1995)  
What do dysfunctional serpins tell us about molecular mobility and disease?  
*Nat. Struct. Biol.* **2**, 96-113.
- Steiner G, Sablinskas V, Hübner A, Kuhne C, Salzer R (1999)  
Surface plasmon resonance imaging of microstructured monolayers.  
*J. Mol. Structure* **509**, 265-273.
- Stenberg E, Persson B, Roos H, Urbaniczky C (1991)  
Quantitative determination of surface concentration of protein with surface plasmon resonance using radiolabeled proteins.  
*J. Colloid Interface Sci.* **1**, 513-526.
- Stone SR, Braun PJ, Hofsteenge J (1987)  
Identification of regions of alpha-thrombin involved in its interaction with hirudin.  
*Biochemistry* **26**, 4617-4624.
- Stratikos E, Gettins PG (1999)  
Formation of the covalent serpin-proteinase complex involves translocation of the proteinase by more than 70 Å and full insertion of the reactive center loop into beta-sheet A.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4808-4813.

- Stray SJ, Ceres P, Zlotnick A (2004)  
Zinc ions trigger conformational change and oligomerization of hepatitis B virus capsid protein.  
*Biochemistry* **43**, 9989-9998.
- Strutzenberger K, Borth N, Kunert R, Steinfeldner W, Katinger H (1999)  
Changes during subclone development and ageing of human antibody-producing recombinant CHO cells.  
*J. Biotechnol.* **69**, 215-226.
- Stubbs MT, Oschkinat H, Mayr I, Huber R, Angliker H, Stone SR, Bode W (1992)  
The interaction of thrombin with fibrinogen. A structural basis for its specificity.  
*Eur. J. Biochem.* **206**, 187-195.
- Stubbs MT, Bode W (1993)  
A player of many parts: the spotlight falls on thrombin's structure.  
*Thromb. Res.* **69**, 1-58.
- Subramani S, Mulligan R, Berg P (1981)  
Expression of the mouse dihydrofolate reductase complementary desoxyribonucleic acid in simian virus 40 vectors.  
*Mol. Cell Biol.* **1**, 854-864.
- Swank RT, Munkres KD (1971)  
Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate.  
*Anal. Biochem.* **39**, 462-477.
- Takamori N, Azuma H, Kato M, Hashizume S, Aihara K, Akaike M, Tamura K, Matsumoto T (2004)  
High plasma heparin cofactor II activity is associated with reduced incidence of in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention.  
*Circulation* **109**, 481-486.
- Taketo A (1988)  
DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **949**, 318-324.
- Tan RY, Mabuchi Y, Grabarek Z (1996)  
Blocking the Ca<sup>2+</sup>-induced conformational transitions in calmodulin with disulfide bonds.  
*J. Biol. Chem.* **271**, 7479-7483.
- Tanyi A, Benjamin V, Sadberry AJ, Doctor VM (1995)  
Fluorescence and circular dichroism studies during the interactions of sulfated polysaccharides with antithrombin III.  
*Thromb. Res.* **77**, 505-513.
- Teien AN, Abildgaard U, Hook M (1976)  
The anticoagulant effect of heparan sulfate and dermatan sulfate.  
*Thromb. Res.* **8**, 859-867
- Tew DJ, Bottomley SP (2001)  
Intrinsic fluorescence changes and rapid kinetics of proteinase deformation during serpin inhibition.  
*FEBS Lett.* **494**, 30-33.
- Tiebel B, Aung-Hilbrich LM, Schnappinger D, Hillen W (1998)  
Conformational changes necessary for gene regulation by Tet repressor assayed by reversible disulfide bond formation.  
*EMBO J.* **17**, 5112-5119.

- Tobin JB, Whitt SA, Cassidy CS, Frey PA (1995)  
Low-barrier hydrogen bonding in molecular complexes analogous to histidine and aspartate in the catalytic triad of serine proteases.  
*Biochemistry* **34**, 6919-6924.
- Tollefsen DM, Blank MK (1981)  
Detection of a new heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma.  
*J. Clin. Invest.* **68**, 589-596.
- Tollefsen DM, Majerus DW, Blank MK (1982)  
Heparin cofaktor II: purifikation and properties of a heparin-depent inhibitor of thrombin in human plasma.  
*J. Biol. Chem.* **257**, 2162-2169.
- Tollefsen DM, Pestka CA, Monafu WJ (1983)  
Activation of heparin cofaktor II by dermatan sulfate.  
*J. Biol. Chem.* **258**, 6713-6716.
- Tollefsen DM, Pestka CA (1985<sup>a</sup>)  
Heparin cofaktor II activity in patients with disseminated intravascular coagulation and hepatic failure.  
*Blood* **66**, 769-774.
- Tollefsen DM, Pestka CA (1985<sup>b</sup>)  
Modulation of heparin cofaktor II activity by histidine-rich glycoprotein and platelet factor 4.  
*J. Clin. Invest.* **75**, 496-501.
- Tollefsen DM, Peacock ME, Monafu WJ (1986)  
Molecular size of dermatan sulfate oligosaccharides required to bind and activate heparin cofaktor II.  
*J. Biol. Chem.* **261**, 8854-8858.
- Tollefsen DM (1995)  
Insight into the mechanism of action of heparin cofaktor II.  
*Thromb. Haemost.* **74**, 1209-1214.
- Tollefsen DM (2002)  
Heparin cofaktor II deficiency.  
*Arch. Pathol. Lab. Med.* **126**, 1394-1400.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979)  
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Urlaub G, Chasin LA (1980)  
Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 4216-4220.
- Uversky VN, Gillespie JR, Millett IS, Khodyakova AV, Vasilenko RN, Vasiliev AM, Rodionov IL, Kozlovskaya GD, Dolgikh DA, Fink AL, Doniach S, Permyakov EA, Abramov VM (2000a)  
Zn(2+)-mediated structure formation and compaction of the "natively unfolded" human prothymosin alpha.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 663-668.
- Uversky VN, Gillespie JR, Fink AL (2000b)  
Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions?  
*Proteins* **41**, 415-427.

- Uversky VN, Permyakov SE, Zagranichny VE, Rodionov IL, Fink AL, Cherskaya AM, Wasserman LA, Permyakov EA (2002)  
Effect of zinc and temperature on the conformation of the gamma subunit of retinal phosphodiesterase: a natively unfolded protein.  
*J. Proteome. Res.* **1**, 149-159.
- Vallee BL, Falchuk KH (1993)  
The biochemical basis of zinc physiology.  
*Physiol. Rev.* **73**, 79-118.
- van Boeckel CA, Grootenhuis PD, Visser A (1994)  
A mechanism for heparin-induced potentiation of antithrombin III.  
*Nat. Struct. Biol.* **1**, 423-425.
- Van Deerlin VM, Tollefsen DM (1991)  
The N-terminal acidic domain of heparin cofactor II mediates the inhibition of alpha-thrombin in the presence of glycosaminoglycans.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 20223-20231.
- van Gent D, Sharp P, Morgan K, Kalsheker N (2003)  
Serpins: structure, function and molecular evolution.  
*Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**, 1536-1547.
- van Hove JL, Yang HW, Wu JY, Brady RO, Chen YT (1996)  
High-level production of recombinant human lysosomal acid alpha-glucosidase in Chinese hamster ovary cells which targets to heart muscle and corrects glycogen accumulation in fibroblasts from patients with Pompe disease.  
*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 65-70.
- Verhamme IM, Bock PE, Jackson CM (2004)  
The preferred pathway of glycosaminoglycan-accelerated inactivation of thrombin by heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **279**, 9785-9795.
- Villa P, Aznar J, Vaya A, Espana F, Ferrando F, Mira Y, Estelles A (1999)  
Hereditary homozygous heparin cofactor II deficiency and the risk of developing venous thrombosis.  
*Thromb. Haemost.* **82**, 1011-1014.
- Vogelstein B, Gillespie D (1979)  
Preparative and analytical purification of DNA from agarose.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**, 615-619.
- Weber K, Osborn M (1969)  
The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.  
*J. Biol. Chem.* **244**, 4406-4412.
- Weinberger SR, Morris TS, Pawlak M (2000)  
Recent trends in protein biochip technology.  
*Pharmacogenomics* **1**, 395-416.
- Weiss B, Jacquemin-Sablon A, Live TR, Fareed GC, Richardson CC (1968)  
Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from *Escherichia coli* infected with bacteriophage T4.  
*J. Biol. Chem.* **243**, 4543-4555.

- Weitz JI, Young E, Johnston M, Stafford AR, Fredenburgh JC, Hirsh J (1999)  
Vasoflux, a new anticoagulant with a novel mechanism of action.  
*Circulation* **99**, 682-689.
- Welford K (1991)  
Surface plasmon-polaritons and their uses.  
*Opt. Quant. Electronics*, **23**, 1-27.
- Wells MJ, Sheffield WP, Blajchman MA (1999)  
The clearance of thrombin-antithrombin and related serpin-enzyme complexes from the circulation: role of various hepatocyte receptors.  
*Thromb. Haemost.* **81**, 325-337.
- Wen D, Corina K, Chow EP, Miller S, Janmey PA, Pepinsky RB (1996)  
The plasma and cytoplasmic forms of human gelsolin differ in disulfide structure.  
*Biochemistry* **35**, 9700-9709.
- Westrup D, Ragg H (1993)  
Secondary thrombin-binding site, glycosaminoglycan binding domain and reactive center region of leusepin-2 are strongly conserved in mammalian species.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1217**, 93-96.
- Wetlaufer DB, Branca PA, Chen GX (1987)  
The oxidative folding of proteins by disulfide plus thiol does not correlate with redox potential.  
*Protein Eng.* **1**, 141-146.
- Wheeler CJ, Sukhu L, Yang G, Tsai Y, Bustamente C, Felgner P, Norman J, Manthorpe M (1996)  
Converting an alcohol to an amine in a cationic lipid dramatically alters the co-lipid requirement, cellular transfection activity and the ultrastructure of DNA-cytosine complexes.  
*Biochim. Biophys. Acta.* **1280**, 1-11.
- Whinna HC, Blinder MA, Szewczyk M, Tollefsen DM, Church FC (1991)  
Role of lysine 173 in heparin binding to heparin cofactor II.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 8129-8135.
- Whinna HC, Choi HU, Rosenberg LC, Church FC (1993)  
Interaction of heparin cofactor II with biglycan and decorin.  
*J. Biol. Chem.* **268**, 3920-3924.
- Whinna HC, Church FC (1994)  
Characterization of a synthetic peptide from the glycosaminoglycan binding site of heparin cofactor II.  
*Lett. Pep. Sci.* **1**, 3-8.
- Whisstock JC, Irving JA, Bottomley SP, Pike RN, Lesk AM (1999)  
Serpins in the *Caenorhabditis elegans* genome.  
*Proteins* **36**, 31-41.
- Whisstock JC, Pike RN, Jin L, Skinner R, Pei XY, Carrell RW, Lesk AM (2000)  
Conformational changes in serpins: II. The mechanism of activation of antithrombin by heparin.  
*J. Mol. Biol.* **301**, 1287-1305.
- Whitehouse RC, Prasad AS, Rabbani PI, Cossack ZT (1982)  
Zinc in plasma, neutrophils, lymphocytes, and erythrocytes as determined by flameless atomic absorption spectrophotometry.  
*Clin. Chem.* **28**, 475-480.

- Whitehouse RC, Prasad AS, Cossack ZT (1983)  
Determination of ultrafiltrable zinc in plasma by flameless atomic absorption spectrophotometry.  
*Clin. Chem.* **29**, 1974-1977.
- Widdowson EM, McCance RA, Spray CM (1951)  
The chemical composition of the human body.  
*Clin. Sci.* **10**, 113-125.
- Wilchek M, Bayer EA (1988)  
The avidin-biotin complex in bioanalytical applications.  
*Anal. Biochem.* **171**, 1-32.
- Wilchek M, Jakoby WB (1974)  
The literature on affinity chromatography.  
*Methods Enzymol.* **34**, 3-10.
- Williams RK, Straus SE (1997)  
Specificity and affinity of binding of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B to glycosaminoglycans.  
*J. Virol.* **71**, 1375-1380.
- Winter R, Noll F (1998)  
Methoden der Biophysikalischen Chemie.  
Teubner, Stuttgart.
- Winter J, Klappa P, Freedman RB, Lilie H, Rudolph R (2002)  
Catalytic activity and chaperone function of human protein-disulfide isomerase are required for the efficient refolding of proinsulin.  
*J. Biol. Chem.* **277**, 310-317.
- Wittler J (2000)  
Aufarbeitung heterologer extra- und intrazellulärer Proteine mit Hilfe der Metallchelate-Protein-Affinitätswechselwirkung.  
Dissertation, Technische Fakultät, Universität Bielefeld.
- Woodhead NE, Long WF, Williamson FB (1986)  
Binding of zinc ions to heparin. Analysis by equilibrium dialysis suggests the occurrence of two, entropy-driven, processes.  
*Biochem. J.* **237**, 281-284.
- Wright PE, Dyson HJ (1999)  
Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein structure-function paradigm.  
*J. Mol. Biol.* **293**, 321-331.
- Wunderwald P, Schrenk WJ, Port H (1982)  
Antithrombin BM from human plasma: an antithrombin binding moderately to heparin.  
*Thromb. Res.* **25**, 177-191.
- Yang VW, LaBrenz SR, Rosenberg LC, McQuillan D, Hook M (1999)  
Decorin is a Zn<sup>2+</sup> metalloprotein.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 12454-12460.
- Yang DS, McLaurin J, Qin K, Westaway D, Fraser PE (2000)  
Examining the zinc binding site of the amyloid-beta peptide.  
*Eur. J. Biochem.* **267**, 6692-6698.

- Ye GN, Daniell H, Sanford JC (1990)  
Optimization of delivery of foreign DNA into higher-plant chloroplasts.  
*Plant. Mol. Biol.* **15**, 809-819.
- Ye J, Esmon NL, Esmon CT, Johnson AE (1991)  
The active site of thrombin is altered upon binding to thrombomodulin. Two distinct structural changes are detected by fluorescence, but only one correlates with protein C activation.  
*J. Biol. Chem.* **266**, 23016-23021.
- Yip TT, Nakagawa Y, Porath J (1989)  
Evaluation of the interaction of peptides with Cu(II), Ni(II), and Zn(II) by high-performance immobilized metal ion affinity chromatography.  
*Anal. Biochem.* **183**, 159-171.
- Zammit A, Dawes J (1995)  
Fibrinogen inhibits the heparin cofactor II-mediated antithrombin activity of dermatan sulfate.  
*Blood* **85**, 720-726.
- Zeng FY, Hopp A, Soldner A, Wess J (1999)  
Use of a disulfide cross-linking strategy to study muscarinic receptor structure and mechanisms of activation.  
*J. Biol. Chem.* **274**, 16629-16640.
- Zhang GS, Mehringer JH, Van Deerlin VM, Kozak CA, Tollefsen DM (1994)  
Murine heparin cofactor II: purification, cDNA sequence, expression, and gene structure.  
*Biochemistry* **33**, 3632-3642.
- Zhang F, Fath M, Marks R, Linhardt RJ (2002)  
A highly stable covalent conjugated heparin biochip for heparin-protein interaction studies.  
*Anal Biochem.* **304**, 271-273.
- Zhang F, Wu Y, Ma Q, Hoppensteadt D, Fareed J, Linhardt RJ (2004)  
Studies on the effect of calcium in interactions between heparin and heparin cofactor II using surface plasmon resonance.  
*Clin. Appl. Thromb. Hemost.* **10**, 249-257.
- Zhou A, Carrell RW, Huntington JA (2001)  
The serpin inhibitory mechanism is critically dependent on the length of the reactive center loop.  
*J. Biol. Chem.* **276**, 27541-27547.

# Anhang

## 7.1 Materialienverzeichnis

alkalische Phosphatase, Shrimps (1758250)	Roche Diagnostics
Ampicillin (A9518)	Sigma
Anti-HCII-Antikörper 188/2/1, monokl. IgG 2b aus gefälltem Maus-Ascites	Hoechst
Anti-HCII-Antikörper 92/2/12, monokl. Antikörper IgG1, POD-Konjugat	Hoechst
Anti-human-Antithrombin III aus Kaninchen, 900248	Hoechst
Anti-human-HCII Kaninchenantiserum (Kan 1, Abnahme 7, 02.01.89)	Hoechst
Anti-human-Thrombin Kaninchenantiserum (Ch.-B.: 62HR/08)	Hoechst
Anti-Kaninchen Eselantikörper, IgG Peroxidase-gekoppelt (NA934)	Amersham Biosciences
Antithrombin III (602434)	Roche Diagnostics
Benzamidin (B6506)	Sigma
Bovine Serum Albumin (BSA), Fraktion V, standard grade (K41-001500)	PAA Laboratories
Chelex <sup>®</sup> 100 (C7901)	Sigma
Chromozym TH, <i>N-p-Tosyl-Gly-Pro-Arg-p-nitroanilid</i> (206849)	Roche Diagnostics
$\alpha$ -Chymotrypsin, human (C8946)	Sigma
Coomassie R350	Amersham Biosciences
Dermatansulfat, Chondroitinsulfat B, 42 kDa (avg.), (C3788)	Sigma
Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid, DMP (80490)	Fluka
Dimethylsulfoxid, DMSO	Merck
Dithiothreitol, DTT (D0632)	Sigma
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium:	
D-MEM, Low Glucose (31600-091)	GIBCO <sup>™</sup> , Life Technologies
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium:	
Nutrient Mixture F-12, D-MEM/F12, 1:1 Mixture (32500-035)	GIBCO <sup>™</sup> , Life Technologies
ECL <sup>™</sup> Western Blotting Detection Reagents (RPN 2106)	Amersham Biosciences
<i>Eco</i> R1- Endonuklease	Gencraft
Fötale Kälberserum, FCS (A15-043)	PAA Laboratories
Geneticinsulfat, G418 (P27-011)	PAA Laboratories
Glutathion, reduziert (G6524)	Sigma
Glutathion, oxidiert (G6654)	Sigma
Heparin, <i>porcine intestinal mucosa</i> , 15 kDa (avg.), (H3393)	Sigma
Heparin-Biotin-Konjugat, <i>porcine intestinal mucosa</i> , 15 kDa (avg.)	Calbiochem, Merck Biosciences
<i>Hind</i> III-Endonuklease	Gencraft
Hybond <sup>™</sup> -P, Blot-Membran (RPN303F)	Amersham Biosciences

Hyperfilm™ ECL™, Radiographiefilme (RPN3103K)	Amersham Biosciences
Hypoxanthin (H9636)	Sigma
ImmunoPure® Gentle Binding Buffer Ag/Ab (21012)	Pierce
ImmunoPure® Gentle Elution Buffer Ag/Ab (21027)	Pierce
Kanamycin (11815-024)	GIBCO™, Life Technologies
Kupfer(II)(1,10-Phenanthrolin)dichlorid (36,220-4)	Aldrich
Lennox L Broth Base (12780-029)	Invitrogen™, Life Technologies
Lennox L Agar (22700-025)	Invitrogen™, Life Technologies
Lipofectamin Plus (10964-013)	Invitrogen™, Life Technologies
LMW-Molekulargewichtsmarker (17-0446-01)	Amersham Biosciences
Penicillin G (P-3032)	Biochrom AG
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF (P7626)	Sigma
H-D-Phe-Pro-Arg-chloromethylketon, PPACK (1065.0005)	Bachem
Polyethylenglykol 8000, PEG 8000 (P4463)	Sigma
<i>Pst</i> I-Endonuklease	New England Biolabs
Rinderinsulin	Sigma
RNase A (0675)	Amresco
<i>Sca</i> I-Endonuklease	New England Biolabs
<i>Sma</i> I-Endonuklease	New England Biolabs
Sojabohnen-Trypsininhibitor (T9003)	Sigma
Human Plasma, for manufacturing use only	Sera-Tec Biologicals
Standard-Human-Plasma (ORKL 12)	Behring
Streptomycin (722K779117)	Biochrom AG
<i>N</i> -Succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe- <i>p</i> -nitroanilid (S7388)	Sigma
T4 DNA-Ligase (0799009)	Roche Diagnostics
Tetracyclin (Q100-19)	Invitrogen™, Life Technologies
<i>N</i> ', <i>N</i> ', <i>N</i> ', <i>N</i> '-Tetramethylethyldiamin, TEMED (87687)	Fluka
$\alpha$ -Thrombin, human (T1063)	Sigma
<i>TMB Microwell Peroxidase System</i> (50-76-00)	Kirkegaard & Perry, Dunn
<i>N</i> $\alpha$ -Tosyl-L-lysin-chloromethylketon, TLCK (90182)	Fluka
Transferrin, human (112456-001)	Roche Diagnostics
Trypanblau-Lösung, 0,4 % (T8154)	Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung, 1-fach (T3924)	Sigma
Thymidin (T9003)	Sigma

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

### 7.2.1 Allgemeine Abkürzungen

$\mu$	Mikro-, $\cdot 10^{-6}$
AES	Anregungs-Emissionspektroskopie
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure
ATIII	Antithrombin III
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
avg.	durchschnittlich
Bp	<i>basepairs</i> / Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i> / Rinderserum-Albumin
ccc	<i>covalently closed circular</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>

CHO DUKX B1	CHO Zelllinie (ATCC Nr.: CRL-9010)
CMV	Cytomegalievirus
Col E1 ori	bakterieller Plasmid-Replikationsursprung
COS	CV1 Origin SV40, Zelllinie der afrikanischen grünen Meerkatze
COS7	COS-Zelllinie (ATCC Nr.: CRL-1651)
cv	column volume
d	Tag
Da	Dalton, relative Molekülmasse
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DHFR	Dihydrofolatreduktase, Tetrahydrofolat-Dehydrogenase
D-MEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMP	Dimethyl-pimelimidat-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngiger DNA
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol, (±)-threo-1,4-Dimercapto-2,3-butanediol
E. coli	Escherichia coli
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethydiamintetracetat
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
et al.	et alii / und andere
f1 ori	Replikationsursprung des f1-Phagen
FCS	fetal calf serum
FPLC	fast protein liquid chromatography
G418	Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin
g	Gravitationskraft (9,81 Meter/Sekunde <sup>2</sup> )
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan
GSH	reduzierendes Gluthathion
GSSG	oxidierendes Gluthathion
gv	gel volume
h	Stunde
HCII	Heparinkofaktor II (Synonym: Leuserpin-2)
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	human immunodeficiency virus
HRP	horse radish peroxidase
IDA	Imidodiacetat
IgG	Immunglobulin G
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i> / Metallionen-Affinitätschromatographie
k	Kilo-, x 10 <sup>3</sup>
k <sub>2</sub>	Reaktionsgeschwindigkeit zweiter Ordnung
kB	Kilobasen
K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilo-Dalton, relative Molekülmasse x 10 <sup>3</sup>
l	Liter
LB	Lennox L Broth Base
LMW	low molecular weight
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
m	Meter
m	Milli-, *10 <sup>-3</sup>
M	molar, mol/l
M13 ori	Replikationsursprung des Phagen M13
MCS	multiple cloning site
min	Minute
MTX	Methotrexat, Amethopterin

MW	Molekülmasse (molecular weight)
MWCO	molecular weight cut off / Molekülmassen-Ausschluß (Maß für Porengröße)
n	Nano-, *10 <sup>-9</sup>
OD <sub>x</sub>	optische Dichte bei $\lambda = X$ nm
ori	<i>origin</i> / Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> / phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
p	para-
p	Pico-, *10 <sup>-12</sup>
pg	Picogramm
pHCII	Plasmid mit HCII-kodierender Region
rHCII	rekombinante Proteinvariante von HCII
pMB1 ori	bakterieller Replikationsursprung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POD	Peroxidase
rpm	<i>rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
rek.	rekombinant
RT	Raumtemperatur
RU	<i>response units</i> , eine RU entspricht einer Massenänderung von 1pg/mm <sup>2</sup>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Serpin	Serinprotease-Inhibitor
SI	Stöchiometrie der Inhibierung
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i> / Oberflächenplasmonresonanz
sup F	amber-Suppressor tRNA-Gen
SV40 ori	Replikationsursprung des SV40-Virus
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TC	Tris/Citrat
TC/Amp	Tetracyclin/Ampicillin
TMB	Tetramethylbenzidin
TS	Tris gepufferte Salzlösung
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Units</i>
ü. N.	über Nacht
USP	<i>United States Pharmacopoeia</i>
UV	ultraviolett
v/v	<i>volume per volume</i>
w/v	<i>weight per volume</i>
wt	Wildtyp bzw. wildtypisch

## 7.2.2 Aminosäuren

Aminosäure	Abkürzungen		DNA Codons
Alanin	Ala	A	GCA, GCC, GCG, GCT
Cystein	Cys	C	TGC, TGT
Aspartat	Asp	D	GAC, GAT
Glutamat	Glu	E	GAA, GAG
Phenylalanin	Phe	F	GGA, GGC, GGG, GGT
Histidin	His	H	CAC, CAT
Isoleucin	Ile	I	ATA, ATC, ATT
Lysin	Lys	K	AAA, AAG
Leucin	Leu	L	TTA, TTG, CTA, CTC, CTG, CTT
Methionin	Met	M	ATG
Asparagin	Asn	N	AAC, AAT
Prolin	Pro	P	CCA, CCC, CCG, CCT
Glutamin	Gln	Q	CAA, CAG
Arginin	Arg	R	CGA, CGC, CGG, CGT
Serin	Ser	S	TCA, TCC, TCG, TCT, AGC, AGT
Threonin	Thr	T	ACA, ACC, ACG, ACT
Valin	Val	V	GTA, GTC, GTG, GTT
Tryptophan	Trp	W	TGG
Tyrosin	Tyr	Y	TAC, TAT

## 7.3 cDNA- und Aminosäuresequenz von HCII (wt)

-19	Met	Lys	His	Ser	Leu	Asn	Ala	Leu	Leu	Ile	Phe	Leu	Ile	Ile	Thr	Ser	Ala	Trp	Gly		
	ATG	AAA	CAC	TCA	TTA	AAC	GCA	CTT	CTC	ATT	TTC	CTC	ATC	ATA	ACA	TCT	GCG	TGG	GGT	2	
1	Gly	Ser	Lys	Gly	Pro	Leu	Asp	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly	Glu	Thr	Ala	Gln	Ser	Ala	Asp	
	GGG	AGC	AAA	GGC	CCG	CTG	GAT	CAG	CTA	GAG	AAA	GGA	GGG	GAA	ACT	GCT	CAG	TCT	GCA	GAT	62
21	Pro	Gln	Trp	Glu	Gln	Leu	Asn	Asn	Lys	Asn	Leu	Ser	Met	Pro	Leu	Leu	Pro	Ala	Asp	Phe	
	CCC	CAG	TGG	GAG	CAG	TTA	AAT	AAC	AAA	AAC	CTG	AGC	ATG	CCT	CTT	CTC	CCT	GCC	GAC	TTC	122
41	His	Lys	Glu	Asn	Thr	Val	Thr	Asn	Asp	Trp	Ile	Pro	Glu	Gly	Glu	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	
	CAC	AAG	GAA	AAC	ACC	GTC	ACC	AAC	GAC	TGG	ATT	CCA	GAG	GGG	GAG	GAG	GAC	GAC	GAC	TAT	182
61	Leu	Asp	Leu	Glu	Lys	Ile	Phe	Ser	Glu	Asp	Asp	Asp	Tyr	Ile	Asp	Ile	Val	Asp	Ser	Leu	
	CTG	GAC	CTG	GAG	AAG	ATA	TTC	AGT	GAA	GAC	GAC	GAC	TAC	ATC	GAC	ATC	GTC	GAC	AGT	CTG	242
81	Ser	Val	Ser	Pro	Thr	Asp	Ser	Asp	Val	Ser	Ala	Gly	Asn	Ile	Leu	Gln	Leu	Phe	His	Gly	
	TCA	GTT	TCC	CCG	ACA	GAC	TCT	GAT	GTG	AGT	GCT	GGG	AAC	ATC	CTC	CAG	CTT	TTT	CAT	GGC	302
101	Lys	Ser	Arg	Ile	Gln	Arg	Leu	Asn	Ile	Leu	Asn	Ala	Lys	Phe	Ala	Phe	Asn	Leu	Tyr	Arg	
	AAG	AGC	CGG	ATC	CAG	CGT	CTT	AAC	ATC	CTC	AAC	GCC	AAG	TTC	GCT	TTC	AAC	CTC	TAC	CGA	362
121	Val	Leu	Lys	Asp	Gln	Val	Asn	Thr	Phe	Asp	Asn	Ile	Phe	Ile	Ala	Pro	Val	Gly	Ile	Ser	
	GTG	CTG	AAA	GAC	CAG	GTC	AAC	ACT	TTC	GAT	AAC	ATC	TTG	ATA	GCA	CCC	GTT	GGC	ATT	TCT	422
141	Thr	Ala	Met	Gly	Met	Ile	Ser	Leu	Gly	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	His	Glu	Gln	Val	His	Ser	
	ACT	GCG	ATG	GGT	ATG	ATT	TCC	TTA	GGT	CTG	AAG	GGA	GAG	ACC	CAT	GAA	CAA	GTG	CAC	TGC	482

161										170										180
Ile	Leu	His	Phe	Lys	Asp	Phe	Val	Asn	Ala	Ser	Ser	Lys	Tyr	Glu	Ile	Thr	Thr	Ile	His	
ATT	TTG	CAT	TTT	AAA	GAC	TTT	GTT	AAT	GCC	AGC	AGC	AAG	TAT	GAA	ATC	ACG	ACC	ATT	CAT	542
181										190										200
Asn	Leu	Phe	Arg	Lys	Leu	Thr	His	Arg	Leu	Phe	Arg	Arg	Asn	Phe	Gly	Tyr	Thr	Leu	Arg	
AAT	CTC	TTC	CGT	AAG	CTG	ACT	CAT	CGC	CTC	TTC	AGG	AGG	AAT	TTT	GGG	TAC	ACA	CTG	CGG	602
201										210										220
Ser	Val	Asn	Asp	Leu	Tyr	Ile	Gln	Lys	Gln	Phe	Pro	Ile	Leu	Leu	Asp	Phe	Lys	Thr	Lys	
TCA	GTC	AAT	GAC	CTT	TAT	ATC	CAG	AAG	CAG	TTT	CCA	ATC	CTG	CTT	GAC	TTC	AAA	ACT	AAA	662
221										230										240
Val	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Phe	Ala	Glu	Ala	Gln	Ile	Ala	Asp	Phe	Ser	Asp	Pro	Ala	Phe	Ile	
GTA	AGA	GAG	TAT	TAC	TTT	GCT	GAG	GCC	CAG	ATA	GCT	GAC	TTC	TCA	GAC	CCT	GCC	TTC	ATA	722
241										250										260
Ser	Lys	Thr	Asn	Asn	His	Ile	Met	Lys	Leu	Thr	Lys	Gly	Leu	Ile	Lys	Asp	Ala	Leu	Glu	
TCA	AAA	ACC	AAC	AAC	CAC	ATC	ATG	AAG	CTC	ACC	AAG	GGC	CTC	ATA	AAA	GAT	GCT	CTG	GAG	782
261										270										280
Asn	Ile	Asp	Pro	Ala	Thr	Gln	Met	Met	Ile	Leu	Asn	Cys	Ile	Tyr	Phe	Lys	Gly	Ser	Trp	
AAT	ATA	GAC	CCT	GCT	ACC	CAG	ATG	ATG	ATT	CTC	AAC	TGC	ATC	TAC	TTC	AAA	GGA	TCC	TGG	842
281										290										300
Val	Asn	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Met	Thr	His	Asn	His	Asn	Phe	Arg	Leu	Asn	Glu	Arg	Glu	
GTG	AAT	AAA	TTC	CCA	GTG	GAA	ATG	ACA	CAC	AAC	CAC	AAC	TTC	CGG	CTG	AAT	GAG	AGA	GAG	902
301										310										320
Val	Val	Lys	Val	Ser	Met	Met	Gln	Thr	Lys	Gly	Asn	Phe	Leu	Ala	Ala	Asn	Asp	Gln	Glu	
GTA	GTT	AAG	GTT	TCC	ATG	ATG	CAG	ACC	AAG	GGG	AAC	TTC	CTC	GCA	GCA	AAT	GAC	CAG	GAG	962
321										330										340
Leu	Asp	Cys	Asp	Ile	Leu	Gln	Leu	Glu	Tyr	Val	Gly	Gly	Ile	Ser	Met	Leu	Ile	Val	Val	
CTG	GAC	TGC	GAC	ATC	CTC	CAG	CTG	GAA	TAC	GTG	GGG	GGC	ATC	AGC	ATG	CTA	ATT	GTG	GTC	1022
341										350										360
Pro	His	Lys	Met	Ser	Gly	Met	Lys	Thr	Leu	Glu	Ala	Gln	Leu	Thr	Pro	Arg	Val	Val	Glu	
CCA	CAC	AAG	ATG	TCT	GGG	ATG	AAG	ACC	CTC	GAA	GCG	CAA	CTG	ACA	CCC	CGG	GTG	GTG	GAG	1082
361										370										380
Arg	Trp	Gln	Lys	Ser	Met	Thr	Asn	Arg	Thr	Arg	Glu	Val	Leu	Leu	Pro	Lys	Phe	Lys	Leu	
AGA	TGG	CAA	AAA	AGC	ATG	ACA	AAC	AGA	ACT	CGA	GAA	GTG	CTT	CTG	CCG	AAA	TTC	AAG	CTG	1142
381										390										400
Glu	Lys	Asn	Tyr	Asn	Leu	Val	Glu	Ser	Leu	Lys	Leu	Met	Gly	Ile	Arg	Met	Leu	Phe	Asp	
GAG	AAG	AAC	TAC	AAT	CTA	GTG	GAG	TCC	CTG	AAG	TTG	ATG	GGG	ATC	AGG	ATG	CTG	TTT	GAC	1202
401										410										420
Lys	Asn	Gly	Asn	Met	Ala	Gly	Ile	Ser	Asp	Gln	Arg	Ile	Ala	Ile	Asp	Leu	Phe	Lys	Hlis	
AAA	AAT	GGC	AAC	ATG	GCA	GGC	ATC	TCA	GAC	CAA	AGG	ATC	GCC	ATC	GAC	CTG	TTC	AAG	CAC	1262
421										430										440
Gln	Gly	Thr	Ile	Thr	Val	Asn	Glu	Glu	Gly	Thr	Gln	Ala	Thr	Thr	Val	Thr	Thr	Val	Gly	
CAA	GGC	ACG	ATC	ACA	GTG	AAC	GAG	GAA	GGC	ACC	CAA	GCC	ACC	ACT	GTG	ACC	ACG	GTG	GGG	1322
441										450										460
Phe	Met	Pro	Leu	Ser	Thr	Gln	Val	Arg	Phe	Thr	Val	Asp	Arg	Pro	Phe	Leu	Phe	Leu	Ile	
TTC	ATG	CCG	CTG	TCC	ACC	CAA	GTC	CGC	TTC	ACT	GTC	GAC	CGC	CCC	TTT	CTT	TTC	CTC	ATC	1382
461										470										480
Tyr	Glu	His	Arg	Thr	Ser	Cys	Leu	Leu	Phe	Met	Gly	Arg	Val	Ala	Asn	Pro	Ser	Arg	Ser	
TAC	GAG	CAC	CGC	ACC	AGC	TGC	CTG	CTC	TTC	ATG	GGA	AGA	GTG	GCC	AAC	CCC	AGC	AGG	TCC	1442